

**Vergleichende Untersuchung möglicher pro- oder
antioxidativer Eigenschaften verschiedener Pflanzen-
Phenole in vitro**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Dipl.- Med. Elisabeth Förstemann
geboren am 13. Oktober 1959 in Gera

Gutachter

1. Prof. Dr. Ch. Fleck, Jena
2. Prof. Dr. R. Klinger, Jena
3. Prof. Dr. H. Glatt, Potsdam

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2003

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1. Pflanzen-Phenole | 7 |
| 1.1.1. Pflanzen-Phenole und ihre Wirkungen auf den Organismus | 7 |
| 1.1.2. Aufbau und chemische Struktur der Flavonoide | 9 |
| 1.2. Das Cytochrom P450-System | 11 |
| 1.2.1. Die Bedeutung der Biotransformation für den Organismus | 11 |
| 1.2.2. Der Reaktionszyklus des Cytochrom P450 | 13 |
| 1.3. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) | 17 |
| 1.3.1. Die Bildung von ROS durch Cytochrom P450 | 17 |
| 1.3.2. Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der Entstehung von Krankheiten | 18 |
| 1.3.3. Schutzmechanismen zur Inaktivierung freier Radikale | 19 |
| 1.4. Zielstellung der Arbeit | 20 |
| 2. Material und Methoden | 23 |
| 2.1. Substanzen | 23 |
| 2.2. Versuchstiere | 31 |
| 2.3. Materialgewinnung | 31 |
| 2.3.1. Präparation der Mikrosomen | 31 |
| 2.3.2. Messung des Proteingehaltes der Mikrosomen | 32 |
| 2.4. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften mittels Oxidase-Modellreaktionen | 33 |
| 2.4.1. NADPH/Fe ²⁺ -stimulierte Lipidperoxidation in Lebermikrosomen | 33 |
| 2.4.2. Bestimmung der H ₂ O ₂ -Bildung in Lebermikrosomen | 34 |
| 2.4.3. Luminol- und Lucigenin-verstärkte mikrosomale Chemilumineszenz | 36 |
| 2.4.3.1. Luminol-verstärkte Chemilumineszenz | 37 |
| 2.4.3.2. Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz | 38 |

| | Seite |
|--|-----------|
| 2.5. Bestimmung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz im Rattenvollblut | 38 |
| 2.6. Bestimmung der Radikalbildung mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System | 40 |
| 2.7. Spektrales Bindungsverhalten am Cytochrom P450 | 40 |
| 2.8. Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse | 42 |
| 3. Versuchsergebnisse | 44 |
| 3.1. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Oxidase-Funktion des Cytochrom P450 | 44 |
| 3.1.1. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die stimulierte Lipidperoxidation | 44 |
| 3.1.2. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die H ₂ O ₂ -Bildung | 48 |
| 3.1.3. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz | 52 |
| 3.1.4. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz | 52 |
| 3.2. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut | 59 |
| 3.3. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System | 59 |
| 3.4. Spektrales Bindungsverhalten der untersuchten Substanzen an das Cytochrom P450 | 66 |
| 3.5. Ergebnisübersicht | 69 |
| 4. Diskussion | 70 |
| 4.1. Einfluß der Prüfsubstanzen auf die Oxidase-Funktion des Cytochrom P450 | 71 |

| | Seite |
|--|---------|
| 4.1.1. NADPH/Fe ²⁺ -stimulierte Lipidperoxidation | 71 |
| 4.1.2. H ₂ O ₂ -Bildung | 72 |
| 4.1.3. Lucigenin- und Luminol-verstärkte Chemilumineszenz | 73 |
| 4.2. Einfluß der Prüfsubstanzen auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut | 74 |
| 4.3. Einfluß der Prüfsubstanzen auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System | 75 |
| 4.4. Spektrales Bindungsverhalten der Prüfsubstanzen | 76 |
| 4.5. Struktur-Wirkungs-Beziehungen | 76 |
| 5. Zusammenfassung | 82 |
| 6. Literaturverzeichnis | 84 |
| Ehrenwörtliche Erklärung | 107 |
| Danksagung | 108 |
| Lebenslauf | 109 |

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|--------------|--|
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| CL | Chemilumineszenz |
| CYP | Enzym der Cytochrom P450-Familie |
| Cyt P450 | Cytochrom P450 |
| DGE | Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| HW | Hauptwert |
| Lc | Lucigenin |
| Lc-CL | Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz |
| LDL | Low density lipoprotein |
| Lm | Luminol |
| Lm-CL | Luminol-verstärkte Chemilumineszenz |
| LPO | NADPH/Fe ²⁺ -stimulierte Lipidperoxidation |
| LW | Leerwert |
| MDA | Malondialdehyd |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| PBSGA-Puffer | Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Glucose und Albumin |
| RLU | relative light units |
| ROS | reaktive Sauerstoff-Spezies |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| TAEC | trolox equivalent antioxidant capacity |
| TBA | Thiobarbitursäure |
| TBARS | Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen |
| TCA | Trichloressigsäure |
| VB-CL | Vollblut-Chemilumineszenz |
| XO | Xanthinoxidase |
| XO-CL | Xanthinoxidase-Chemilumineszenz |

1. Einleitung

„Eure Nahrung ist euer Heilmittel“, besagt eine über 2400 Jahre alte Weisheit, die Hippokrates zugesprochen wird. Als griechischer Arzt und Begründer der Schule der Hippokraten wurde durch ihn bereits 400 v. Ch. über präventive Maßnahmen nachgedacht. Im Mittelalter erklärte der deutsche Arzt Theophrast Bombast von Hohenheim, besser bekannt als Paracelsus: „Die Dosis allein macht das Gift“. Er war der Überzeugung, daß durch Addition von möglichst vielen Kräutern deren Wirkung noch gesteigert werden kann, sprach aber im Zusammenhang mit Gesundheit noch nicht von der Bedeutung der Ernährung.

Bestimmte Wirkstoffe in Heilpflanzen und Nahrungsmitteln haben seit Jahrhunderten ihren festen Platz in der Heilkunde. Heute werden sie unter dem Begriff sekundäre Pflanzenstoffe zusammengefaßt, insgesamt sind es über 100.000 Substanzen. Einige Tausend davon kommen in der Nahrung vor. Kräuter enthalten sie oftmals in besonders hoher Konzentration, daher auch ihre Bedeutung in der Pharmazie.

Sekundäre Pflanzenstoffe entstehen erst im Sekundärstoffwechsel der Pflanze und auch nur in geringen Mengen. Sie erfüllen struktur-, aroma- und farbbildende Funktionen. Jede Pflanze produziert ein für sie charakteristisches Muster an sekundären Pflanzenstoffen. Da die Pflanzen im Gegensatz zum tierischen Organismus kein Ausscheidungssystem besitzen, werden Zwischen- und Endprodukte des Stoffwechsels in Vesikeln oder Vakuolen eingelagert und stehen im Bedarfsfall zur Verfügung. Auch viele Pflanzenphenole werden so gespeichert. Einige sekundäre Pflanzenstoffe kann man wahrnehmen, z. B. das Violett der Aubergine, das Rot der Tomate, das Orange der Karotte. Manch andere kann man riechen, wie z. B. den Duft von Zitrone, Pfefferminze oder Knoblauch. Und viele kann man schmecken, insbesondere bei intensiven Gewürzen wie Kümmel, Paprika oder Chili.

Seit Generationen werden sekundäre Pflanzenstoffe bewußt genutzt. Heute sind von vielen sekundären Pflanzenstoffen entzündungshemmende, antimikrobielle, verdauungsfördernde, Blutdruck- und Cholesterin-senkende, antioxidative, krebsprotektive und immunstimulierende Wirkungen bekannt (ANTONY et al. 1999, BASILE et al. 1999, BEATTY et al. 2000, KELLOFF et al. 2000, MOLINE et al. 2000, OWEN et al. 2000, PUUPPONEN-PIMIAE et al. 2001, RIEMERSMA et al. 2001, SANTOS et al. 1999).

1.1. Pflanzen-Phenole

1.1.1. Pflanzen-Phenole und ihre Wirkungen auf den Organismus

Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe sind weit verbreitet und übertreffen in Menge und Vielfalt alle anderen sekundären Pflanzenstoffe. Eine einzige Pflanzenart kann bis zu 30 verschiedene phenolische Inhaltsstoffe aufweisen. Sie befinden sich in den Randschichten von Gemüse, Obst und Vollkorngetreide, z. B. in Äpfeln, Kirschen, Zitrusfrüchten, Erdbeeren, Himbeeren, Weintrauben, Grünkohl, grünen Bohnen, Brokkoli, Kopfsalat, Feldsalat und Endivien. Die Konzentrationen innerhalb der Arten sind unterschiedlich (DING et al. 2001, KARAKAYA et al. 2001, MEAN und MOHAMED 2001, TÖRRÖNEN et al. 2000). Pflanzen aus dem Freilandanbau weisen einen höheren Gehalt auf als Pflanzen aus dem Gewächshaus. Viele Gewürze verdanken ihre geschmacklichen Eigenschaften den Polyphenolen, z. B. das Curcumin der Kurkuma im Curry oder das Capsaicin im Chili. Aber auch in Tee (WEISBURGER 1996), insbesondere im grünen Tee (SCHLESIER et al. 1999), in Wein (GERMAN und WALZEM 2000, DE LORIMIER 2000), Kaffee (LAKENBRINK et al. 2000), Kakao und in Nüssen sind Pflanzen-Phenole zu finden (DUTHIE und CROZIER 2000).

Nach den Veröffentlichungen zum „Französischen Paradoxon“ stieg das Interesse an den Untersuchungen zu phenolischen Pflanzenstoffen. In Frankreich liegt die Mortalitätsrate von Herz-Kreislauf-Erkrankungen deutlich unterhalb derer von Deutschland, Großbritannien und den USA. Vergleichbar hoch liegen in allen Ländern die Serum-Cholesterin-Werte und die Aufnahmemengen an gesättigten Fettsäuren. Erklärt wird dieses Paradoxon mit dem Rotweinkonsum und der mediterranen Ernährungsweise in Frankreich, die verbunden ist mit einem höheren Verzehr an Gemüse (incl. Olivenöl) und Obst (FITO et al. 2000, FRANKEL et al. 1993, RENAUD und DE LORGERIL 1992, WOLLIN und JONES 2001). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die in Holland durchgeführte Zutphen-Studie. Es konnte eine positive Relation zwischen einer erhöhten Aufnahmemenge von Pflanzenphenolen und der dadurch verminderten Mortalität bei koronaren Herzerkrankungen nachgewiesen werden (HERTOG et al. 1993).

Die antioxidative Aktivität vieler Pflanzen-Phenole ist höher als die der antioxidativ wirkenden Vitamine E und C (LEE et al. 1998, PAGANGA et al. 1999, RICE-EVANS et al. 1997). Sie inhibieren die Autooxidation ungesättigter Lipide und verhindern so die Bildung von oxidierten Lipoproteinen (BÖHM et al. 1999, BORS et al. 1996, MORTON et al. 2000,

ZIELISKI und KOZOWSKA 2000). Gegenüber Tumorerkrankungen haben Polyphenole ebenfalls schützende Eigenschaften (ARBISER et al. 1998, BRADLOW et al. 1999, SURH 1999, WENZEL 1998, YIN et al. 1999). Auch hier zeigte der Verzehr von Obst und Gemüse stärkere Einflüsse als die Zufuhr von β -Karotin und der Vitamine E und C als Medikamente. Phenolcarbonsäuren und Flavonoide blockieren die Tumorinduktion. Sie hemmen darüber hinaus das Wachstum neoplastischer Zellen (BLOCK et al. 1992). Das National Cancer Institute in den USA und die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE) empfehlen, wegen der positiven Effekte der sekundären Pflanzenstoffe mindestens fünf Portionen Obst und Gemüse täglich aufzunehmen (BITSCH 1996, KLOOS 1999). Eine Aussage über definierte Zufuhrmengen pro Tag läßt sich allerdings nicht machen (ANDLAUER und FÜRST 1998, CROFT 1998, SCALBERT und WILLIAMSON 2000).

In der Tabelle 1 wird die antioxidative Aktivität einiger phenolischer Pflanzenstoffe im Vergleich zu den Vitaminen C und E dargestellt.

Tabelle 1: Relative antioxidative Aktivität von Flavonoiden und Vitaminen sowie zugehörige Lebensmittel (modifiziert nach BÖHM et al. 1999 und RICE-EVANS et al. 1997); *gemessen als TAEC-Wert (trolox equivalent antioxidant capacity); dies entspricht der Konzentration an Trolox (mmol/l), die die gleiche antioxidative Aktivität aufweist wie eine 1 mmolare Lösung der untersuchten Substanz.

| Antioxidative Verbindung | | Vorkommen | Antioxidative Aktivität [mmol/l]* |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Vitamine | Vitamin C | Obst, Gemüse | $1,0 \pm 0,02$ |
| | Vitamin E | Getreide, Nüsse, Öle | $1,0 \pm 0,03$ |
| Flavonoide/Anthro-cyanidine | Oenin | Rote Trauben | $1,8 \pm 0,02$ |
| | Cyanidin | Trauben, Himbeeren, Erdbeeren | $4,4 \pm 0,12$ |
| Flavon-3-ole | Quercetin | Äpfel, Beeren, Rote Trauben | $4,7 \pm 0,10$ |
| | Kaempferol | Grapefruit | $1,3 \pm 0,08$ |
| Flavone | Rutin | Äpfel, Beeren, Rote Trauben | $2,4 \pm 0,12$ |
| | Chrysin | verschiedene Fruchtschalen | $1,4 \pm 0,07$ |
| | Apigenin | Sellerie, Petersilie | $1,5 \pm 0,08$ |
| Flavan-3-ole | (Epi)catechin | Rote Trauben | $2,4 \pm 0,02$ |
| Flavanone | Naringenin | Citrusfrüchte | $1,5 \pm 0,05$ |
| Hydroxyzimtsäuren | Kaffeesäure | Weißer Trauben | $1,3 \pm 0,01$ |
| | Chlorogensäure | Äpfel, Birnen, Kirschen, Pfirsiche | $1,3 \pm 0,02$ |
| | Ferulasäure | Weißer Trauben | $2,2 \pm 0,06$ |

1.1.2. Aufbau und chemische Struktur der Flavonoide

Um die Vielzahl an Substanzen unterschiedlicher Pflanzen-Phenole zu differenzieren, wurden sie in zwei Gruppen aufgeteilt: Phenolcarbonsäuren und Flavonoide (RHODES und PRICE 1997, WILLIAMSON et al. 2000). Die Phenolcarbonsäuren wiederum werden unterteilt in Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate. Zu den Hydroxybenzoesäure-Derivaten in Früchten gehören u. a. die Gallussäure und die Vanillinsäure. Zu den Hydroxyzimtsäureabkömmlingen zählen Kaffeesäure, Ferulasäure und Chlorogensäure. Flavonoide sind als Biosyntheseprodukte der Hydroxyzimtsäuren anzusehen (Bioflavonoide) und kommen meist gemeinsam mit ihnen vor. Bioflavonoide sind die Hauptbestandteile roter, blauer und gelber Pigmente. In den äußeren Schichten und Schalen ist ihr Anteil besonders groß (BITSCH 1996). Alle Flavonoide weisen in ihrer Grundstruktur zwei aromatische und einen O-heterozyklischen Ring auf. Durch Modifizierungen an diesem Grundgerüst können über 4000 in der Natur vorkommende Flavonoide bestimmt werden. Außerdem können die Hydroxylgruppen zusätzlich noch mit einem Zuckerrest verbunden sein. Die wichtigsten Untergruppen sind die farblosen Catechine, die rot bis blau gefärbten Anthrocyanidine, die hellgelben Flavonole und Flavone sowie die farblosen Proanthrocyanidine (HERRMANN 1994, RHODES 1996). Bekannte Vertreter sind beispielsweise Quercetin und Kaempferol (Flavonole) und Apigenin (Flavone). Flavonoide sind sowohl Hydroxylradikalfänger als auch Reaktionspartner für Peroxyradikale. Neben diesen Eigenschaften können auch direkte Hemmwirkungen auf einzelne Enzyme ausgeübt werden (BORS et al. 1996, BREINHOLT et al. 1999, HOLLMAN und KATAN 1999).

Flavonoide stellen die größte Gruppe der Pflanzenphenole dar. Sie leiten sich vom Flavan (2-Phenyl-benzodihydropyran) ab. Die Grundstruktur besteht aus zwei Benzolringen, die über eine heterozyklische Verbindung von drei Kohlenstoffatomen und Sauerstoff aneinander gebunden sind. Die insgesamt drei Ringe werden mit den Großbuchstaben A, B und C gekennzeichnet. Die einzelnen Kohlenstoffatome und auch das Heteroatom im C-Ring sind fortlaufend nummeriert (Abb. 1).

Unter den Flavonoiden sind die Flavonole, die Flavone, die Catechine sowie deren Glykosidverbindungen am weitesten verbreitet. Einige Besonderheiten der verschiedenen Flavonoide sind in der Abbildung 2 dargestellt.

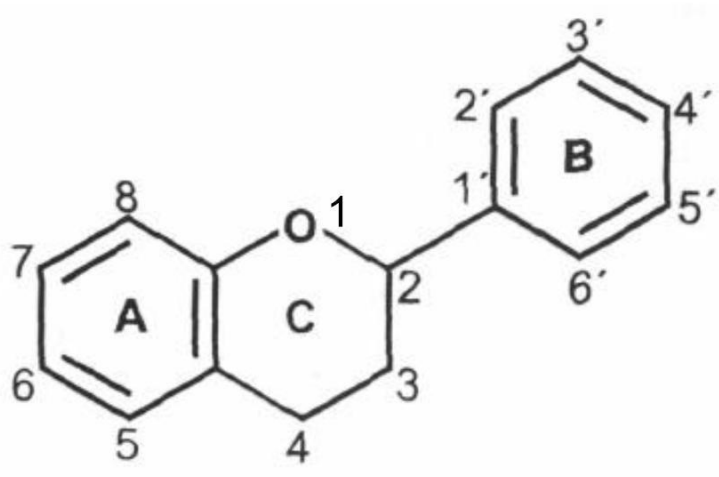


Abb. 1: Grundstruktur und Nomenklatur der Flavonoide (nach BRAVO 1998)

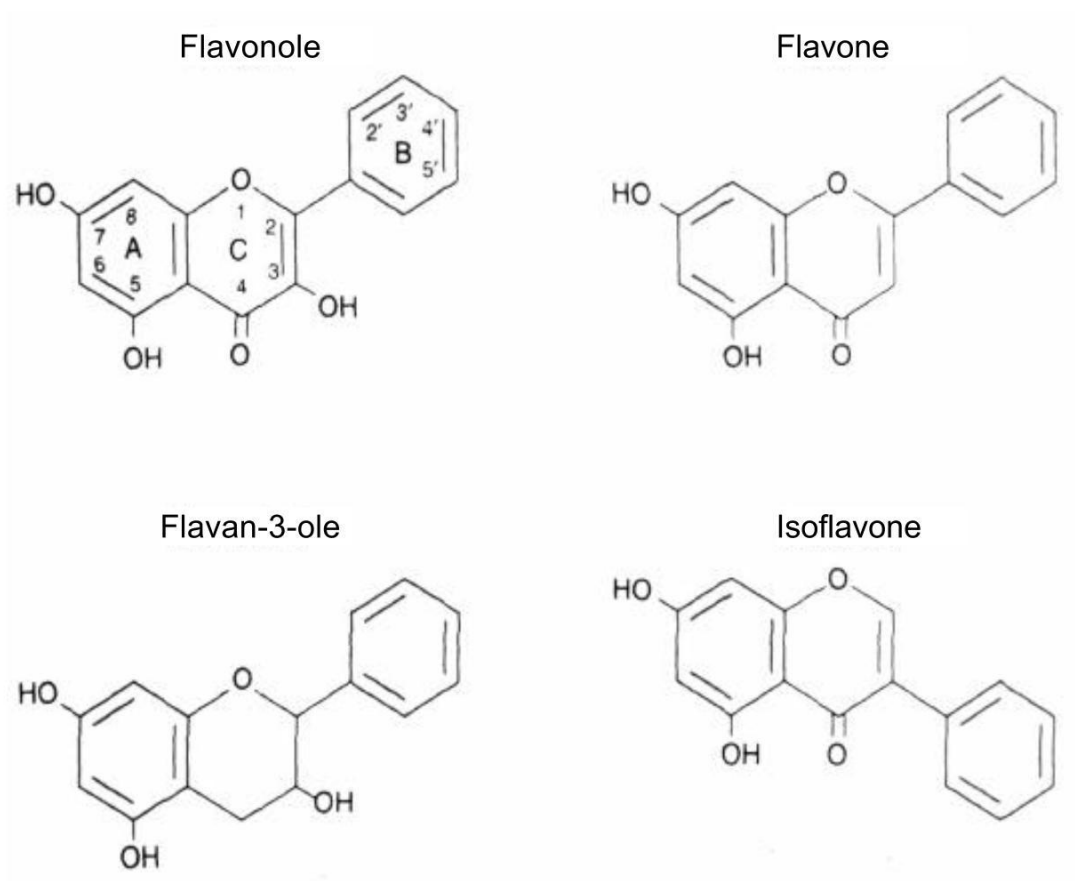


Abb. 2: Strukturformeln von einigen der wichtigsten Gruppen der Flavonoide: Flavonole, Flavone, Flavanole und Isoflavone (nach RICE-EVANS et al. 1997)

1.2. Das Cytochrom P450 System

1.2.1. Die Bedeutung der Biotransformation für den Organismus

Gemeinsam mit den lebensnotwendigen Nährstoffen, wie Kohlenhydraten, Eiweißen und Fetten werden täglich auch für den Organismus nicht zu verwertende Stoffe aufgenommen. Diese aufgenommenen Fremdstoffe (Xenobiotika) müssen ständig eliminiert werden, um eine Anreicherung dieser Stoffe und damit verbunden eine Schädigung des Organismus zu verhindern. Der lebende Organismus ist einer großen Vielfalt von verschiedenen Substanzen ausgesetzt. Einige davon sind essentiell zur Erhaltung des Lebens bzw. haben medizinischen Wert, während jedoch die meisten ohne funktionelle Bedeutung für den jeweiligen Organismus sind. Der Begriff Xenobiotika ist auch von der betrachteten Spezies abhängig, d. h. eine Substanz, die für eine Art fremd ist, kann für die andere ein normales Stoffwechselprodukt darstellen.

Ein entscheidender Faktor für die Eliminierbarkeit einer Substanz ist deren Wasserlöslichkeit (Hydrophilie). Lipophile Stoffe können sich auf Grund ihrer geringen renal Ausscheidung im Organismus anreichern. Voraussetzung für deren Ausscheidung ist in fast allen Fällen eine vorherige enzymatische Umwandlung. Die Biotransformation vollzieht sich dabei zumeist in zwei Schritten, wobei die Umwandlung von lipophilen Ausgangsverbindungen in hydrophilere Reaktionsprodukte erfolgt. Dies ermöglicht erst die Elimination der Metaboliten aus dem Körper. Bei Säugetieren sind die Haupteliminationswege für Abfallprodukte und Fremdstoffe die Ausscheidung mit dem Urin bzw. der Galle (ÅSTRÖM und DE PIERRE 1986, FICHTL et al. 1992).

Das wichtigste Organ, in dem die Biotransformation beim Menschen stattfindet, ist die Leber. Die für die Biotransformation verantwortlichen Enzyme sind in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und teilweise auch in den Mitochondrien verankert. Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulums, die durch fraktionierte Zentrifugation von Leberzellhomogenaten hergestellt werden können, bezeichnet man als Mikrosomen.

Im ersten Schritt der Biotransformation, den sog. Phase-I-Reaktionen wird durch eine oxidative Veränderung der Ausgangssubstanz deren Lipophilie verringert. Bei den Phase-II-Reaktionen werden die zu metabolisierenden Substrate mit körpereigenen Stoffwechselprodukten gekoppelt. Die Phase-II-Metabolite sind in der Regel stark hydrophil und werden somit leicht mit dem Harn oder der Galle ausgeschieden (FUHRMANN 1994, KLINGER 1982, KLINGER 1996, PFEIFER et al. 1995). Ca. 95% der

entstandenen Produkte sind biologisch inaktiv. In rund 5% kommt es aber auch zur Bildung toxischer Metabolite (MÜLLER 1990).

Die Entdeckung des mikrosomalen Monooxygenase-Systems mit Cytochrom P450 (Cyt P450) gehörte zu den bedeutendsten Leistungen der Grundlagenforschung im vergangenen Jahrhundert (PFEIFER et al. 1995). Im Jahre 1958 wurde erstmals über eine mikrosomale Verbindung in der Leber, welche nach Reduktion durch NADPH und Zugabe von Kohlenmonoxid bei einer Wellenlänge von 450 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, berichtet (GARFINKLE 1958, KLINGENBERG 1958). 1961 wurde dieses Pigment als P450-Hämoprotein beschrieben und in den Folgejahren charakterisiert (COOPER et al. 1965, LU und COON 1968, OMURA und SATO 1961, 1964-a, b). Bereits 1959 wurde entdeckt, daß die Behandlung von Ratten mit Benzpyren Einfluß auf den mikrosomalen Metabolismus verschiedener Substanzen hat, wobei in Abhängigkeit von der Substanz induzierende oder hemmende Effekte gefunden werden konnten. Diese Entdeckung führte zu der Vermutung, daß eine Reihe von Enzymen existiert, welche ähnliche Reaktionen katalysieren (CONNEY et al. 1959). 1982 wurden dann die ersten cDNA-Sequenzen eines Cyt P450 beschrieben (FUJII-KURIYAMA et al. 1982). Bis Anfang der achtziger Jahre konnte Cyt P450 in nahezu allen Geweben nachgewiesen werden, wobei die höchste Konzentration in der Leber gemessen wurde. Im gleichen Zeitraum erfolgte die Aufklärung der ersten membranständigen Cyt P450-Aminosäuresequenz (HANIU et al. 1982, HEINEMANN und OZOLS 1983). 1985 konnte erstmals die Raumstruktur eines mikrobiellen Cyt P450 dargestellt werden (POULUS et al. 1985).

Durch das Cyt P450-System wird ein unermessliches Spektrum strukturell verschiedener Substrate oxidativ metabolisiert und eliminiert. So stellt es einerseits den Hauptweg für die Umwandlung körperfremder lipophiler Substanzen in wasserlösliche Produkte dar, wodurch deren Elimination aus dem Körper erleichtert wird. Ohne diesen Mechanismus würde eine Reihe von Xenobiotika im Organismus akkumulieren. Desweiteren kann, wie bereits erwähnt, dieses Enzymsystem aber auch Fremdstoffe in stärker toxische Substanzen umwandeln. Nicht zuletzt wird eine Vielzahl von körpereigenen Substanzen, zum Beispiel Steroide, Fettsäuren, Vitamine, Gallensäuren, Thromboxane und Prostaglandine, metabolisiert (ÅSTRÖM und DE PIERRE 1986, FICHTL et al. 1992, RUCKPAUL 1993).

1.2.2. Der Reaktionszyklus des Cytochrom P450 Systems

Trotz der unterschiedlichen Funktionen ist der Wirkmechanismus aller Enzyme der Cyt P450-Familie gleich. Sie sind imstande, molekularen Sauerstoff zu binden, auf reduktivem Wege zu spalten, ein Atom Sauerstoff auf das Substrat zu übertragen und das zweite in Form von Wasser freizusetzen (Abb. 3).

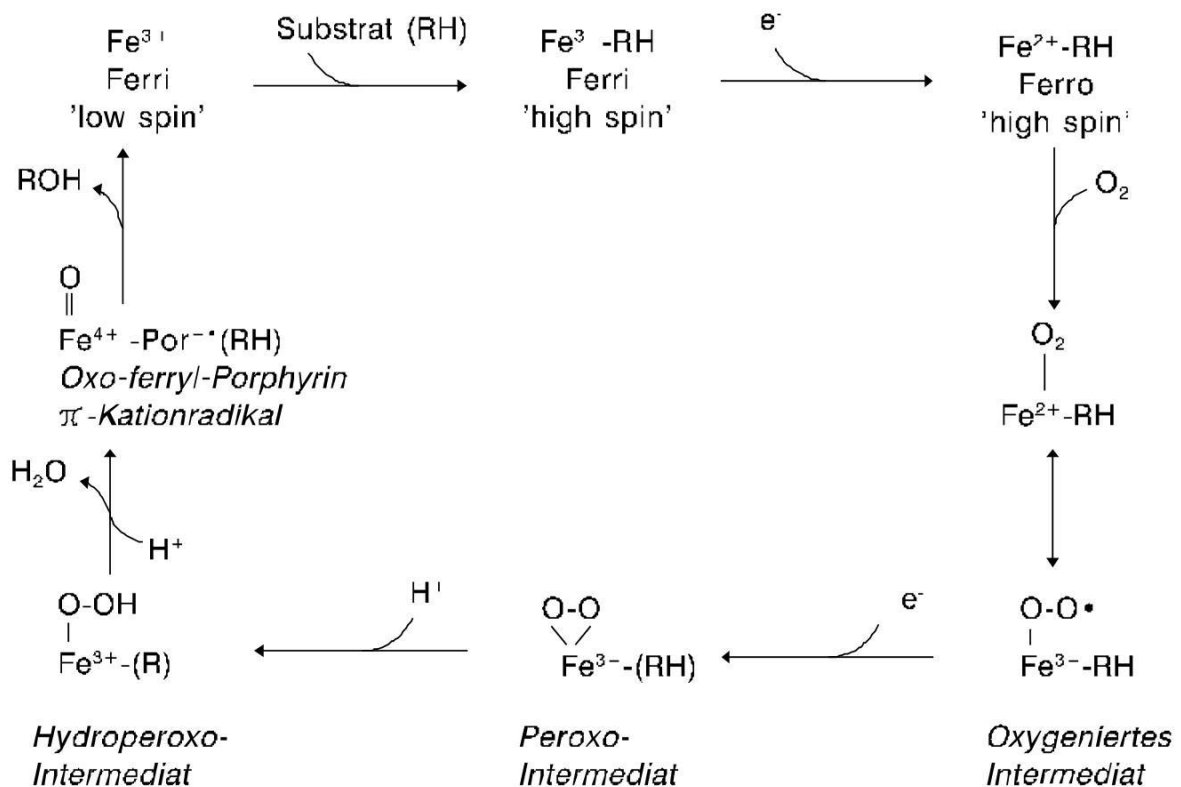


Abb. 3: Schema der P450-abhängigen Monooxygenasereaktion

RH = Substrat, Fe = Hämeisen, Por = Porphyrin; die kursiv gesetzten Intermediate wurden noch nicht identifiziert (nach IMAI et al. 1989, modifiziert nach GIBSON und SKETT 1996, GUENGERICH 1993, RUCKPAUL 1993)

Die Monooxygenierung eines Substrates durch das Cyt P450 verläuft also in insgesamt fünf aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten, wobei zweimal je ein Elektron aufgenommen wird. Der Reaktionszyklus, wie in Abbildung 3 dargestellt, soll kurz beschrieben werden (GIBSON und SKETT 1996, LEWIS 1996):

Als erster Reaktionsschritt erfolgt die Substratbindung an das dreiwertige Eisen im Häm-Anteil des Cyt P450. Dadurch wird das magnetische Gleichgewicht des Cyt P450 vom „Low-Spin“ in den „High-Spin“-Zustand geändert. Durch die Bindung des Substrates tritt

die typische spektrale Änderung im Differenzspektrum auf. Das geänderte magnetische Gleichgewicht des Cyt P450 hat auch ein verändertes Redoxpotential zur Folge, welches jetzt positiv ist. Da Elektronen immer vom negativen zum positiven Pol fließen, wird die Aufnahme des ersten Elektrons durch das entstandene positive Redoxpotential des Cyt P450 günstig beeinflusst.

Dieses erste Elektron stammt vom NADPH und wird durch die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase auf das Eisen der Häm-Gruppe im Cyt P450 übertragen. Das Eisen wird dadurch zweiwertig und ist nun in der Lage, molekularen Sauerstoff aufzunehmen. Damit ist der zweite Reaktionsschritt vollzogen.

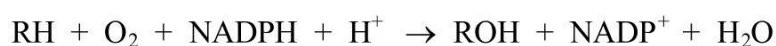
Beim dritten Reaktionsschritt lagert sich nun der molekulare Sauerstoff an das zweiwertige Eisen des Hämkomplexes an. Dabei bildet sich ein oxygenierter Cytochrom-Substrat-Komplex aus. Nach der erfolgten Sauerstoffbindung kann eine intramolekulare Elektronenumlagerung vom Eisen auf den Sauerstoff erfolgen. Damit entsteht ein dreiwertiger Eisenkomplex mit einem Superoxidanion ($O_2^{\bullet -}$ = aktive Form des Sauerstoffs). An dieser Stelle des Reaktionszyklus ist eine Entkopplung durch nicht aktivierbare Substanzen möglich. Dadurch würden reaktive Sauerstoffspezies und andere Radikale freigesetzt, die dann eine Gewebsschädigung zur Folge hätten.

Nach der Aufnahme des molekularen Sauerstoffs erfolgt als vierter Reaktionsschritt die zweite Elektronenübertragung (zweite Reduktion) auf den oxygenierten Cytochrom-Substrat-Komplex. Auch hier kommt das Elektron vom NADPH. Durch die Aufnahme von zwei Protonen, welche ebenfalls aus dem NADPH stammen, entsteht ein Wassermolekül und gleichzeitig oxigenoider Sauerstoff. Auch diese zweite Reduktion führt zur Bildung von aktiviertem Sauerstoff, so daß durch das Hinzukommen der zwei Protonen aus dem NADPH auch stets eine H_2O_2 -Bildung erfolgen kann.

Im letzten Schritt des Reaktionszyklus wird das aktivierte Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen. Das hydroxylierte Substrat (= Reaktionsprodukt) wird freigesetzt und das Cyt P450 steht für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung.

Durch die während des Zyklus ausgeführte doppelte Funktion, die Oxidation des Substrates und die Reduktion des Sauerstoffs, werden die Enzyme des Cyt P450 häufig auch als mischfunktionelle Oxygenasen (Oxidasen) bezeichnet (FICHTL et al. 1992, FUHRMANN 1994, GUENGERICH 1993, PFEIFER et al. 1995, RUCKPAUL 1993).

Zusammenfassend läßt sich folgende Reaktionsgleichung aufstellen:



RH: Substrat; ROH: hydroxyliertes Substrat = Reaktionsprodukt

Die Cyt P450-Enzyme sowie die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase in Säugetieren sind ausnahmslos membranständig (RUCKPAUL 1993). Alle Cyt P450-Enzyme enthalten am N-Terminus eine nicht abspaltbare, hydrophobe Sequenz, mit der sie in der Membran verankert sind. Der restliche Anteil der Cyt P450-Enzyme ist in Richtung des Zytoplasmas im endoplasmatischen Retikulum exponiert. Der Bereich, an dem die Häm-Gruppe über Cystein gebunden ist, ist dabei hochkonserviert. Die Enzyme stehen in der Membran in Kontakt mit der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. In diesen Strukturen erfolgt die Umsetzung der hydrophoben Substrate. Für die Katalysierung der Oxidation des NADPH und die anschließende Übertragung der Reduktionsäquivalente auf das Cytochrom wird das Flavinenzym NADPH-Cytochrom P450-Reduktase benötigt (ELSTNER 1990, FICHTL et al. 1992). Es wird vermutet, daß mehrere Cyt P450-Moleküle ringartig um die Reduktase angeordnet sind und daß das Reduktase-System die Cyt P450-Moleküle aktivieren, d. h. reduzieren kann (ELSTNER 1990).

Bei der Aufnahme von Fremdstoffen, beispielsweise von Arzneimitteln, kann es zu einer Aktivitätserhöhung bzw. -minderung des Cyt P450-Systems kommen. Dabei kann die Aktivitätsminderung durch eine irreversible oder reversible Hemmung ausgelöst werden, wobei hauptsächlich letztere für therapeutische Zwecke heute schon eingesetzt wird (z. B. Antimykotika, Antihypertensiva, Kanzerostatika) (RUCKPAUL 1993). Desgleichen kann durch Aufnahme verschiedener antioxidativ wirksamer Substanzen ein protektiver Schutz erreicht werden.

Ende der achtziger Jahre wurde eine Neugliederung des Cyt P-450 Systems vorgenommen (NEBERT und GONZALEZ 1987). Dabei wurden die Enzyme entsprechend der Übereinstimmung der einzelnen Aminosäuresequenzen aufgegliedert. Die Einteilung erfolgte anhand des Homologiegrades in verschiedene Familien (1, 2, ...). Die Familien wiederum unterteilen sich in Subfamilien (A, B, ...), in die dann die einzelnen Enzyme eingeordnet wurden. 1996 wurden schon über 300 Formen beschrieben. Für Säugetiere sind danach 12 Genfamilien mit 22 Subfamilien bekannt. Beim Menschen wurden bisher 32 verschiedene Cyt P450-Formen nachgewiesen, von denen bereits 17 den entsprechenden Chromosomen zugeordnet werden konnten (LEWIS 1996, NELSON et al. 1993). So wird im Internet eine Datei ständig aktualisiert, in der die verschiedenen bereits beschriebenen Cyt P450-Formen entsprechend der NELSON-Systematisierung aufgeführt sind. 69 verschiedene Genfamilien der unterschiedlichen Spezies (Tiere, Pflanzen, Pilze, Bakterien) werden dort beschrieben.

Auch verschiedene humane Cyt P450-Enzyme sind in dieser Datei aufgeführt (DEGTYARENKO 2000, http://www.icgeb.trieste.it/~p450srv/P450Nom_Full.html).

In der Tabelle 2 sind die wichtigsten Vertreter der Cyt P450-Enzyme mit ihrer Induzierbarkeit und einer Auswahl an typischen Substraten im Überblick dargestellt. Zudem wird die Homologie zwischen orthologen Proteinen von Ratte und Mensch aufgezeigt.

Tabelle 2: Überblick über die am Fremdstoffwechsel beteiligten Cyt P450-Arten.

Zu den nicht ausgefüllten Zeilen wurden von den Autoren keine Angaben gemacht (GONZALEZ 1992, SOUCEK und GUT 1992).

| Cyt P450 Mensch | Gewebe | Induzierbarkeit | typische Substrate | Ratten- Orthologon | Homologie in % |
|--------------------|------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1A1 | diverse | ja | aromat. Kohlenwasserstoffe | 1A1 | 78 |
| 1A2 | Leber | möglich | Coffein | 1A2 | 70 |
| 2A6 | Leber | möglich | Coumarin | 2A3 | 85 |
| 2B6 | Leber | möglich | | 2B1 | 74 |
| 2B7 | Lunge | | | 2B1 | 76 |
| 2C9 | Leber, Darm | | Tolbutamid | 2C11 | 77 |
| 2E1 | Leber, Darm, Leukozyten | ja | Ethanol | 2E1 | 78 |
| 3A3 | Leber | ja | Cyclosporin | 3A1 | 78 |
| 3A4 | Leber, Gastrointestinaltrakt | ja | Nifedipin | 3A1 | 73 |
| 3A5 | Leber | | Cyclosporin | 3A2 | 71 |
| 3A7 | fetale Leber | | Testosteron | 3A2 | 65 |
| 4B1 | Lunge | | | 4B1 | 80 |

1.3. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

1.3.1. Die Bildung von ROS durch Cytochrom P450

Cytochrom P450 kann insgesamt drei Arten von Reaktionen katalysieren (Abb. 4):

- Monooxygenase-Reaktionen, bei denen ein Substrat mit Hilfe molekularen Sauerstoffes hydroxyliert wird (s. dazu auch Abb. 3),
- Oxidase-Reaktionen, bei denen mit Hilfe molekularen Sauerstoffes Superoxidanionen-Radikale bzw. Wasserstoffperoxid produziert werden, und
- Peroxidase-Reaktionen, bei denen die Hydroxylierung des Produktes mit Hilfe von Peroxiden, einschließlich Wasserstoffperoxid erfolgt (ELSTNER 1990, KLINGER et al. 1986, KLINGER 1995).

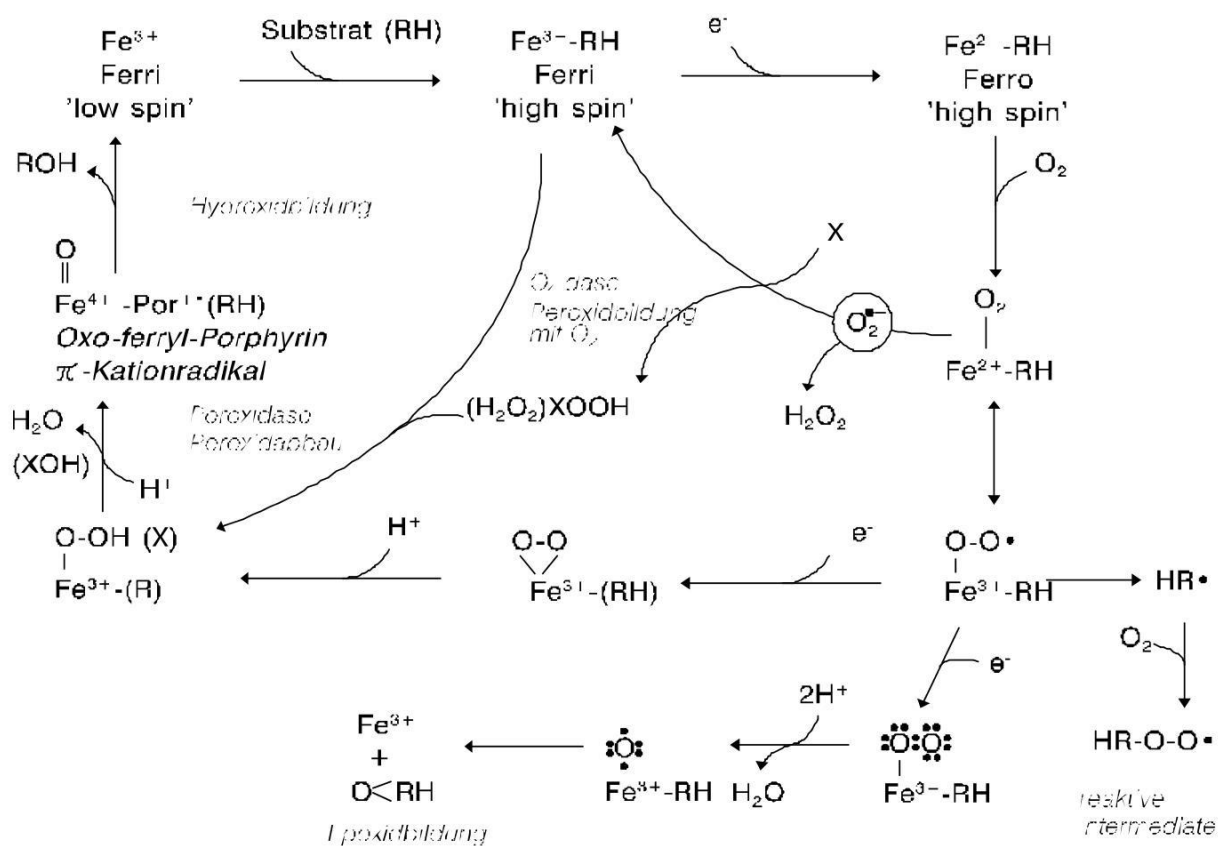


Abb. 4: Schematischer Vergleich der drei Funktionen des Cytochrom P450-Systems (siehe Text). R, X = Substrat der Teilreaktion (ELSTNER 1990, modifiziert)

1.3.2. Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der Entstehung von Krankheiten

Die reaktiven Sauerstoffspezies sind als potentiell zellschädigend anzusehen. Sie können mit allen für die lebende Zelle essentiellen Molekülen reagieren, was u. U. zum Zelltod führt. Radikale können mit den biologischen Systemen reagieren, indem sie Membranschädigungen (z. B. Lipidperoxidation / Lipidspaltung) hervorrufen oder indem sie Proteine angreifen und damit deren Enzymfunktionen blockieren (CHEESEMANN und SLATER 1993, KEHRER 1993). Beispielsweise kann auch das DNS-Molekül ein Ziel freier Radikale sein, was dann möglicherweise Mutagenität und Karzinogenität zur Folge hat (DARGEL 1992). Neben den Prozessen im Cytochrom P450-System werden bei einer Reihe weiterer physiologischer Abläufe Sauerstoffradikale und andere reaktive Sauerstoffspezies gebildet, wobei deren Bildung durch antioxidative Schutzmechanismen reduziert wird. Jedoch kann unter bestimmten Bedingungen die Bildungsrate reaktiver Sauerstoffspezies die Kapazität der antioxidativen Systeme übersteigen, so daß zelluläre Bestandteile oxidativ zerstört werden (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1984, KRETZSCHMAR et al. 1989, YOUNES 1994). Es tritt der sog. „oxidative Streß“ auf. Radikalen wird, abgesehen von physiologischen Prozessen wie z. B. dem Alterungsvorgang (HARMAN 1988), auch zunehmend eine Rolle bei der Pathogenese einiger Erkrankungen, zugeschrieben (NEWMARK 1996, PALADINI et al. 1999). So findet das intrazelluläre Auftreten zytotoxischer reaktiver Sauerstoffspezies zunehmend Beachtung als pathogenetischer Faktor bei der Arteriosklerose, der Glomerulonephritis, der multiplen Sklerose, der Rheumatoidarthritis, dem Morbus Parkinson (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1990), dem Morbus Alzheimer (GASSEN und YODIM 1999, VOLICER und CRINO 1990), dem Diabetes mellitus (MAXWELL 1995, OBERLEY 1988) oder auch bei der Karzinogenese (BLOCK et al. 1992, O'BRIEN 1982). In den vergangenen Jahren wurden verstärkt Anstrengungen unternommen, um mit Hilfe verschiedener Wirkstoffe mit Radikalscavengerfunktionen diese Krankheiten zu therapieren. Neben den am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführten Untersuchungen mit Kalziumantagonisten (LUPP et al. 1995) und mit NMDA-Rezeptorantagonisten (LUPP et al. 1996) wurden auch α -Tocopherol und Trolox auf ihre potentielle antioxidative Wirkung in vitro und in vivo geprüft (HALL et al. 1991).

1.3.3. Schutzmechanismen zur Inaktivierung freier Radikale

In Zellen befinden sich eine Reihe von enzymatischen und nichtenzymatischen Schutzsystemen gegenüber radikalischen Schäden, die freie Radikale und nicht-radikalische reaktive Stoffwechselprodukte direkt abfangen und inaktivieren, oxidative Prozesse unterbinden oder aber bereits eingetretene Schäden reparieren können. Neben enzymatischen Mechanismen (Glutathion-System, Superoxiddismutase und Katalase) gibt es eine große Anzahl von antioxidativ wirkenden Substanzen. Diese antioxidativ wirkenden Substanzen sind in der Lage, entstandene Radikale abzufangen und zu neutralisieren. Sie besitzen damit sog. Scavenger-Eigenschaften. Sowohl Harnsäure als auch Vitamin A und Vitamin E gelten als Scavenger für Singulett-Sauerstoff bzw. Alkoxy-Radikale (LANDVIK et al. 1996, SWANSON und PARKER 1996). Auch für Vitamin C sind solche Scavengereigenschaften bekannt (BUETTNER und JURKIEWICZ 1996, SIES 1997).

Vitamin C ist eine der bekanntesten Verbindungen, die über gute Radikalfänger-Eigenschaften verfügt. Seine Hauptwirkung besteht im Inaktivieren freier Radikale oder bereits oxidierter Metaboliten. In diesen Funktionen nimmt die Vitamin C eine zentrale Stellung ein. Sein Wirkungsspektrum liegt im plasmatischen Raum, wo die Ascorbinsäure in drei Redoxstufen vorliegen kann. Auch als Quencher für Singulett-Sauerstoff erwies sich Ascorbinsäure als hervorragend geeignet (ELSTNER 1990, BROWN und JONES 1996).

Karotinoide existieren in der Natur in verschiedenen Konfigurationen, z. B. α - γ -Karotin oder auch Lycopin. So gilt beispielsweise Lycopin als besserer Scavenger für Singulett-Sauerstoff als β -Karotin. Generell gelten die Karotinoide als Substanzen mit guten Radikalfängereigenschaften für Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroxylradikale (BUB 1998, HANDELMAN 1996, LIVREA et al. 1996, STAHL 1998).

Vitamin E, als Oberbegriff für vier Einzelsubstanzen, den α - δ -Tocopherolen, ist ein Vertreter der bereits bekannten natürlichen Antioxidantien. α -Tocopherol gilt als die potenteste Verbindung, da es beidseits der Hydroxylgruppe methyliert ist. Bei dem Analogon Trolox bleibt über die Hydroxylgruppe die antioxidative Wirkung erhalten, wobei der ursprünglich lange Kettenrest der Tocopherole durch eine Carboxylgruppe ersetzt wurde (BORS 1987). α -Tocopherol entfaltet seine Wirkung im wesentlichen im

lipophilen Membranbereich. Es durchläuft dabei drei Redoxstufen, die bei der Interaktion mit Lipidhydroperoxy- und Alkoxyradikalen auftreten können. Unter der Einwirkung von Ascorbinsäure regenerieren sich die Vitamin E-Radikale und stehen für weitere Reaktionszyklen zur Verfügung. Außerdem sind Tocopherole bekannte Reaktionspartner für Singulett-Sauerstoff unter Bildung von Hydroperoxid (ELSTNER 1990, PACKER 1992).

Harnsäure gilt als effektives Antioxidans und als ein sehr guter Quencher von Singulett-Sauerstoff. Ebenso wie DNS und Proteine werden auch ungesättigte Fettsäuren gegen den Angriff von OH^\bullet -Radikalen geschützt. Neben der Inhibition der Lipidperoxidation ist die Harnsäure auch Scavenger für Singulett-Sauerstoff (ELSTNER 1990, HALLIWELL 1996-b).

Für viele sekundäre Pflanzenstoffe (s. Abschnitt 1.2.) wurden ebensolche Radikalfänger-eigenschaften nachgewiesen (ARORA et al. 1998, BITSCH et al. 1998, BÖHM et al. 1999, BORS et al. 1996, DGE specials [2/95, 1/97, 5/00,3/01], HALLIWELL 1994, MELVILLE 1994, MIURA et al. 1998).

1.4. Zielstellung der Arbeit

Da für alle Oxidationen im Rahmen der Biotransformation Sauerstoff aktiviert werden muß, können auch Sauerstoffradikal-Anionen ohne biologische Funktion anfallen. Dies ist ein potentiell zellschädigendes Phänomen und stellt eine Belastung der Zellen dar. Ausgehend von den bereits nachgewiesenen Radikalfänger-Eigenschaften der Harnsäure sowie der Vitamine A, C und E sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob auch Pflanzen-Phenole antioxidative / prooxidative Eigenschaften aufweisen, d. h. ob sie als sogenannte Scavenger bzw. Radikalfänger wirken und somit die Radikalbildung vermindern oder aber bereits gebildete Radikale neutralisieren können. Dabei sollten die Scavengereffekte mittels verschiedener Methoden verglichen werden, um die quantitativen Unterschiede bei den einzelnen Modellversuchen aufzuzeigen.

Zusammengefaßt lauteten die Ziele der Arbeit wie folgt:

1. Nachweis der prooxidativen/antioxidativen Eigenschaften der Prüfsubstanzen durch Vergleich verschiedener Testmethoden und
2. Aufdeckung von eventuell vorhandenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die die Scavengerfunktion der Pflanzenphenole näher charakterisieren.

Den Hauptanteil der vorliegenden Arbeit nahmen eine Reihe von Versuchen zur Cyt P450 vermittelten Oxidase-Funktion mit Rattenlebermikrosomen ein. Es wurde der Einfluß der Substanzen auf

- die stimulierte Lipidperoxidation (LPO),
- die Wasserstoffperoxidbildung (H_2O_2 -Bildung),
- die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz (Lm-CL) und
- die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz (Lc-CL) untersucht.

Darüber hinaus wurde der Einfluß der Prüfsubstanzen auf weitere in vitro-Modellsysteme ermittelt:

- Messung der Luminol-verstärkten Vollblutchemilumineszenz (VB-CL) der Ratte nach Aktivierung von Leukozyten mittels Zymosan und
- Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System (XO-CL); die hier entstehenden Radikale sind durch die Xanthinoxidase generiert und damit auch unabhängig vom Cyt P450-Zyklus.

Mit Hilfe der Untersuchungen zum spektralen Bindungsverhalten der Prüfsubstanzen am Cyt P450 konnte außerdem untersucht werden, ob die Testsubstanzen mit dem Cyt P450 Bindungen eingehen oder nicht. Durch diese Untersuchungen können ganz allgemeine Aussagen getroffen werden, ob eine der Substanzen mit dem Cyt P450 interagieren kann, d. h. ob eventuell auch mit Wechselwirkungen beim Metabolismus von anderen Fremdstoffen am Cyt P450 gerechnet werden muß. Desweiteren können Schlußfolgerungen gezogen werden, ob die gefundenen Hemmeffekte auf die Oxidase-Modell-Reaktionen auch auf einer Interaktion mit dem Cyt P450-Zyklus beruhen. Eine verminderte Produktion der Radikale in den Versuchen zur Cyt P450 vermittelten Oxidase-Funktion (LPO, H_2O_2 -Bildung, Lc- und Lm-CL) kann auf folgenden Phänomenen beruhen:

- einer „echten“ Scavenger-Eigenschaft der Prüfsubstanz oder aber
- einer verminderten Bildung von Radikalen am Cyt P450 durch Interferenz mit dem Cyt P450.

Die Untersuchungen zur VB-CL und der XO-CL ermöglichen neben einem Methodenvergleich auch eine weitere Beurteilung in Bezug auf „echte“ Scavengereigenschaften der geprüften Substanzen, da bei diesen beiden Modellreaktionen die Radikale unabhängig vom Cyt P450-Zyklus gebildet werden. Bei gleichzeitiger Hemmung aller eingesetzten Modellreaktionen liegen aller Wahrscheinlichkeit nach

„echte“ Scavengereigenschaften vor. Allerdings ist eine gleichzeitige Hemmung des Cyt P450, der NADPH-Oxidase und der XO zwar theoretisch möglich, aber eher unwahrscheinlich.

Zum heutigen Zeitpunkt reicht der Kenntnisstand über die sekundären Pflanzenstoffe nicht aus, um konkrete Angaben über die tägliche Zufuhr zu machen. Fest steht aber, daß der Verzehr von Obst und Gemüse, auf Grund des Gehaltes an sekundären Pflanzenstoffen zur Gesunderhaltung beiträgt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise der zahlreichen Pflanzen-Phenole leisten und deren Bedeutung in unserer Ernährung hervorheben.

2. Material und Methoden

2.1. Substanzen

Es wurden 22 Substanzen auf ihre möglichen prooxidativen oder antioxidativen Eigenschaften hin untersucht. Die Tabelle 3 zeigt einen Überblick über Summenformeln, Molekulargewichte und Strukturformeln der Prüf- und Referenzsubstanzen.

Die einzelnen Substanzen wurden zur besseren Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit in verschiedenen Gruppen zusammengefaßt. Eine Gruppe bilden jeweils die Referenzsubstanzen Ascorbinsäure, β -Karotin, Trolox und Harnsäure.

Die zu untersuchenden Pflanzen-Phenole wurden entsprechend ihrem strukturellen Aufbau gruppiert. So wurden die vier Phenolcarbonsäuren Gallussäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Chlorogensäure gemeinsam dargestellt. Die in der vorliegenden Arbeit geprüften Flavonoide wurden den entsprechenden Untergruppen

- Flavone (Flavon, 5-Hydroxyflavon, Chrysin, Apigenin, Rutin)
- Flavonole (3-Hydroxyflavon, Kaempferol, Quercetin, Myricetin)
- Isoflavone (Daidzein, Genistein)
- Flavanone (Naringenin)
- Flavanole (Catechin) und
- Chalcone (Curcumin) zugeordnet.

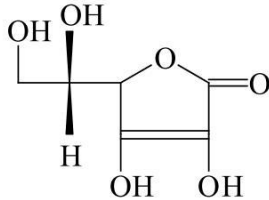
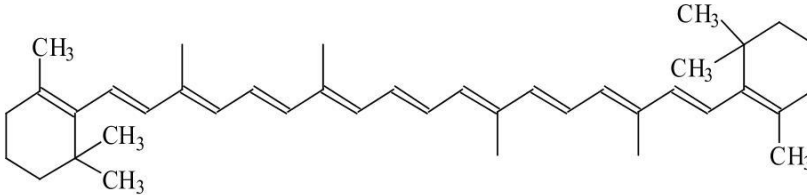
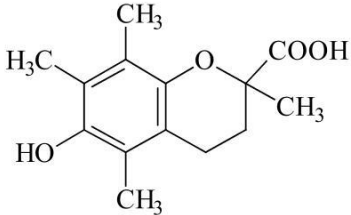
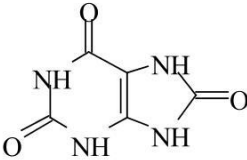
Bei der Auswahl der verschiedenen Pflanzen-Phenole wurden strukturelle Unterschiede ganz bewußt berücksichtigt. Dies kommt beispielsweise in der Verknüpfung von B- und C-Ring zum Ausdruck, sowie bei der Anzahl der OH-Gruppen und deren Positionen. In einigen Untergruppen der Flavonoide wurden deshalb mehrere Substanzen mit differenter Anzahl von OH-Gruppen an verschiedenen Positionen getestet, um eventuell Rückschlüsse über besonders günstige Konstellationen zu ziehen und um damit bestimmte Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufdecken zu können.

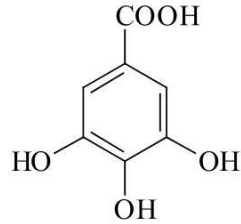
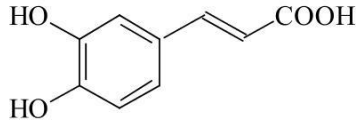
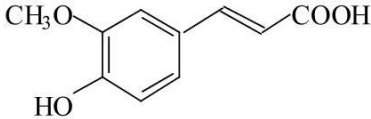
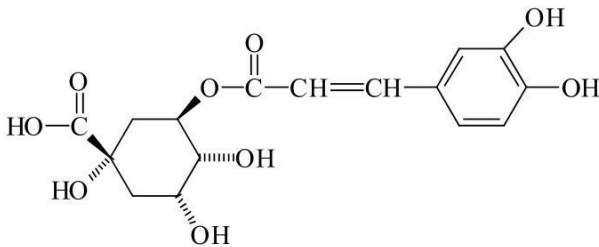
Vor dem Beginn einer jeden Versuchsserie wurde die jeweils zu untersuchende Prüfsubstanz in Lösung gebracht und Verdünnungen in vier Konzentrationen hergestellt:

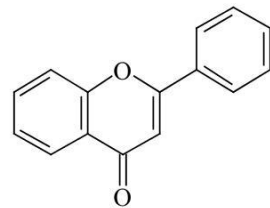
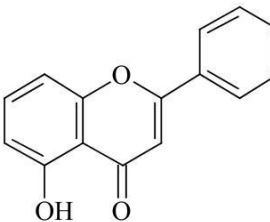
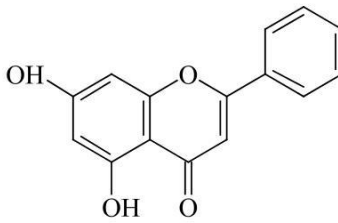
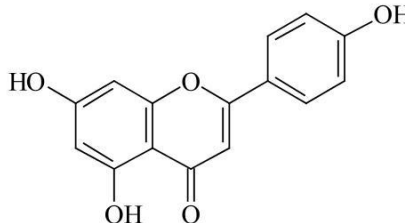
1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM und 0,001 mM. In Aqua dest. konnten lediglich 4 der o. g. Stoffe gelöst werden (Ascorbinsäure, Gallussäure, Harnsäure und Rutin). Alle anderen Stoffe wurden in Methanol gelöst. Bei den in Methanol gelösten Substanzen wurden die Proberöhrchen zu Versuchsbeginn bei der Messung der LPO und der H_2O_2 -Bildung für 5

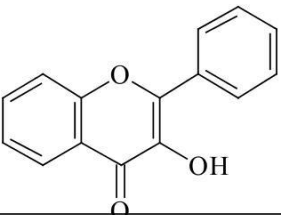
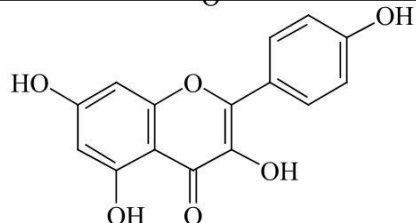
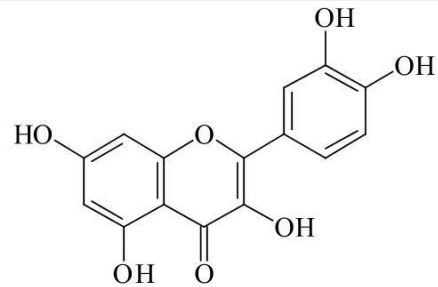
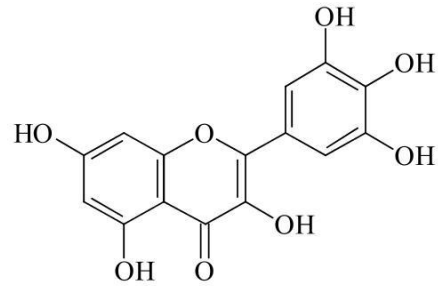
Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt. So konnte das Methanol abgedampft werden. Um das für den Inkubationsansatz nötige Volumen wieder zu erlangen, wurden die Volumina mit Aqua dest. ausgeglichen. Bei den Versuchsreihen, die mit Chemilumineszenzmessungen verbunden waren, erfolgte das Abdampfen des Methanols über Nacht, da die bei diesen Serien eingesetzten Plasteröhrchen einem kochenden Wasserbad nicht ausgesetzt werden konnten.

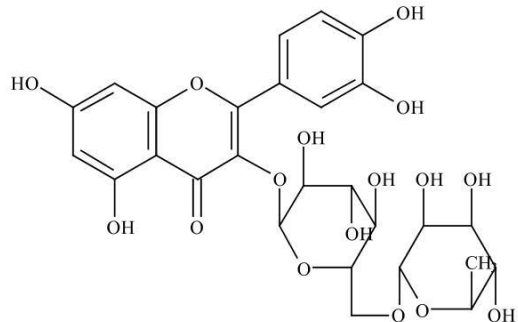
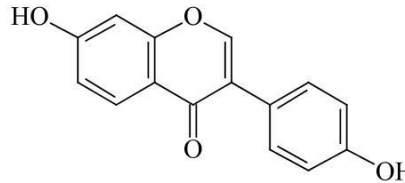
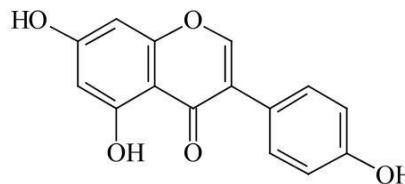
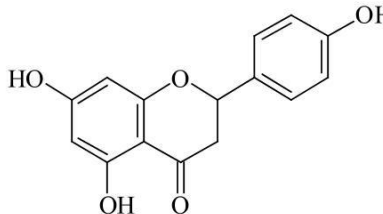
Tabelle 3: Chemische Bezeichnung, Summenformeln, Molekulargewichte und Strukturformeln der Referenz- und Prüfsubstanzen

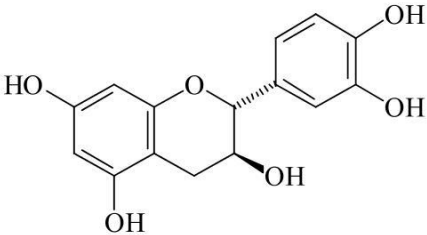
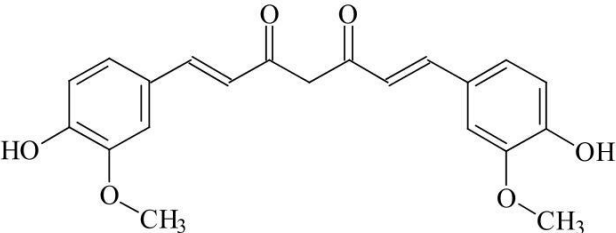
| Referenz-substanz | chem. Bezeichnung | Summenformel | MG | Strukturformel |
|-------------------|--|-------------------|--------|---|
| Ascorbin-säure | 3-Oxo-L-gulofuranolacton | $C_6H_8O_6$ | 176,13 |  |
| β -Karotin | (all-E)-3,7,12,16-Tetramethyl-1,18-bis(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen | $C_{40}H_{56}$ | 536,90 |  |
| Trolox | 3,4-Dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylsäure | $C_{14}H_{18}O_6$ | 282,28 |  |
| Harnsäure | Purin-2,6,8-trion | $C_5H_4N_4O_3$ | 168,11 |  |

| Prüfsubstanz | chem. Bezeichnung | Summenformel | MG | Strukturformel |
|------------------------|------------------------------|-------------------|--------|---|
| Gallussäure | 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure | $C_7H_6O_5$ | 170,11 |  |
| Kaffeesäure | 3,4-Dihydroxycimtsäure | $C_9H_8O_4$ | 180,20 |  |
| Ferulasäure | 4-Hydroxy-3-methoxycimtsäure | $C_{10}H_{10}O_4$ | 194,20 |  |
| Chlorogen-säure | 3-[3,4-Dihydroxycimtsäure] | $C_{16}H_{18}O_9$ | 354,30 |  |

| Prüfsubstanz | chem. Bezeichnung | Summenformel | MG | Strukturformel |
|-------------------------|---------------------------|-------------------|--------|---|
| Flavon | 2-Phenyl-chromon | $C_{15}H_{10}O_2$ | 222,25 |  |
| 5-Hydroxy-flavon | 5-Hydroxy-2-phenylchromon | $C_{15}H_{10}O_3$ | 238,25 |  |
| Chrysin | 5,7-Dihydroxyflavon | $C_{15}H_{12}O_4$ | 254,24 |  |
| Apigenin | 4',5,7-Trihydroxyflavon | $C_{15}H_{10}O_5$ | 270,24 |  |

| Prüfsubstanz | chem. Bezeichnung | Summenformel | MG | Strukturformel |
|-------------------------|--|--------------------------------|--------|---|
| 3-Hydroxy-flavon | 3-Hydroxy-2-phenylchromon | $C_{15}H_{10}O_3$ | 238,25 |  |
| Kaempferol | 3,5,7-Trihydroxy-2-[4-hydroxy-phenyl]-4H-1-benzopyran-4-on | $C_{15}H_{10}O_6$ | 286,20 |  |
| Quercetin | 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon | $C_{15}H_{10}O_7 \times 2H_2O$ | 338,30 |  |
| Myricetin | 3,5,7-Trihydroxy-3',4',5'-trihydroxyflavon | $C_{15}H_{10}O_8$ | 318,20 |  |

| Prüfsubstanz | chem. Bezeichnung | Summenformel | MG | Strukturformel |
|-------------------|---|----------------------|--------|---|
| Rutin | 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon-3-rhamnoglucosid | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | 610,50 |  |
| Daidzein | 4',7-Dihydroxyisoflavon | $C_{15}H_{10}O_4$ | 254,20 |  |
| Genistein | 4',5,7-Trihydroxyisoflavon | $C_{15}H_{10}O_5$ | 270,24 |  |
| Naringenin | 4,5,7-Trihydroxyflavon | $C_{15}H_{12}O_5$ | 272,26 |  |

| Prüfsubstanz | chem. Bezeichnung | Summenformel | MG | Strukturformel |
|-----------------|--|-------------------|--------|---|
| Catechin | (2R,3S)-3,3',4',5,7-Flavanpentol | $C_{15}H_{14}O_6$ | 290,30 |  |
| Curcumin | 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion | $C_{21}H_{20}O_6$ | 368,40 |  |

2.2. Versuchstiere

Die Versuchsserien wurden an Lebermikrosomen und heparinisiertem Vollblut von unbehandelten männlichen HAN:Wistar-Ratten aus der Koloniezucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen unter standardisierten Bedingungen, d. h. Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $50 \pm 10 \%$ und 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus.

Als Nahrung erhielten die Tiere Futterpellets (Zuchtdiät 1316) der Firma Altromin (Lage, Deutschland) und Trinkwasser ad libitum. Zum Zeitpunkt der Organentnahme hatten die Ratten ein Alter von ca. 60 – 90 Tagen. Die Haltung der Tiere und die Organentnahmen erfolgten unter Beachtung der Vorgaben durch das Tierschutzgesetz.

2.3. Materialgewinnung

Die Ratten wurden mit Ether narkotisiert, durch Dekapitation getötet, entblutet und die Leber entnommen. Die Organe wurden gewogen und eisgekühlt (4°C). Das gewonnene Vollblut wurde zur Messung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz verwandt (siehe auch 2.5.).

2.3.1. Präparation der Mikrosomen

Die Präparation wurde mit eisgekühlten Gewebeproben (4°C) vorgenommen. Ein Teil Leber wurde mit zwei Teilen 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt und mittels eines Potter-Elvehjem-Homogenisators homogenisiert. Danach erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 9000 g in einer Kühlzentrifuge vom Typ 5403 der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) (MATSUBARA et al. 1976). Der gewonnene Überstand wurde mit MgCl_2 -Lösung (25 mM) im Verhältnis 1 : 2,5 verdünnt und für weitere 20 Minuten nochmals bei 9000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert (SILMAN et al. 1965).

Das Mikrosomensediment wurde mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4, rehomogenisiert. Die Lebermikrosomen wurden anschließend entweder sofort aufgearbeitet oder bei -80°C eingefroren.

2.3.2. Messung des Proteingehaltes der Mikrosomen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Mikrosomensuspensionen wurde die durch KLINGER und MÜLLER (1974) modifizierte Biuret-Methode angewandt. Deren Prinzip besteht in der Bildung einer blau-violett gefärbten Komplexverbindung durch Proteine und Kupfer-Ionen im alkalischen pH-Bereich. Da die Intensität der Färbung proportional zur Proteinkonzentration ist, kann der Eiweißgehalt in den Lebermikrosomen über die Extinktion ermittelt werden.

Für den Probenansatz wurden 0,25 ml Mikrosomensuspension (1:4 mit Na-Phosphatpuffer verdünnt) mit 0,25 ml 5%-iger Natrium-Desoxycholat-Lösung versetzt. Nach vorsichtiger Durchmischung erfolgte nach 5 Minuten die Zugabe von 4,5 ml Biuret-Reaktionslösung, die wie folgt hergestellt wurde:

- 1,5 g Kupfersulfat x 5 H₂O und
- 6,0 g Kaliumnatrium-Tartrat
- in 500 ml Aqua dest. lösen,
- 300 ml 10 %-ige NaOH zugeben und
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Für jede Probe wurde ein in gleicher Weise hergestellter Ansatz zur Bestimmung der Trübung (= Trübungswert) mitgeführt, der anstelle der Biuret-Reaktionslösung 4,5 ml 3%-ige NaOH-Lösung enthielt. Bei der Bestimmung der Leerwerte für den Probenansatz und für den Trübungswert wurde statt den 0,25 ml Mikrosomensuspension 0,25 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion der Proben- und Trübungsansätze gegen ihre Leerwerte am Spektralphotometer vom Typ Spekol 11 der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland) gemessen. Die Messung erfolgte bei 546 nm und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Von der gemessenen Extinktion des Probenwertes erfolgte die Subtraktion des Trübungswertes. Zur Bestimmung der Eichkurve wurde Rinderserumalbumin der Firma SERVA-Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland) in abfallender Konzentration um je 0,5 mg, beginnend mit 5,0 mg bis 0,5 mg / 0,25 ml Testvolumen, benutzt.

Der Proteingehalt wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Proteingehalt (mg / ml)} = (E_{\text{PR}} - E_{\text{TR}}) \times F_{\text{EK}} \quad (1)$$

E_{PR} = Extinktion des Probenwertes

E_{TR} = Extinktion des Trübungswertes

F_{EK} = Faktor der Eichkurve, dem eine definierte Proteinkonzentration entspricht

2.4. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften mittels Oxidase-Modellreaktionen

2.4.1. NADPH/ Fe^{2+} -stimulierte Lipidperoxidation in Lebermikrosomen

Diese Methode beruht auf dem Nachweis von Malondialdehyd (MDA). MDA ist das Produkt der Spaltung von Endoperoxiden, die durch Oxidation von ungesättigten Fettsäuren mit drei oder mehr Doppelbindungen entstanden sind. Eisen, welches in Form von $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ zugesetzt wurde, und NADPH stimulieren die Cytochrom P450 vermittelte Lipidperoxidation. Als Spaltprodukt der Endoperoxide hat MDA (ca. 60%) innerhalb der oxidierten Lipidbruchstücke den größten Anteil (ESTERBAUER und ZOLLNER 1989, TOMITA et al. 1990). MDA reagiert bei hohen Temperaturen (ca. 96°C) mit Thiobarbitursäure. Es entsteht dabei ein roter Farbkomplex (Trimethin), der colorimetrisch gemessen werden kann (BUEGE und AUST, 1978). Somit gibt die entstandene Menge Trimethin (= TBARS = Thiobarbitursäure-reaktive Stoffe) Auskunft über die während des Umsatzes am Cyt P450 freigesetzten Radikale.

Zur Bestimmung der mikrosomalen NADPH- / Fe^{2+} -stimulierten Lipidperoxidation (LPO) wurde die Proteinkonzentration durch Zugabe von 0,1 M Na-Phosphatpuffer auf 2,5 mg Protein / ml eingestellt.

Der Inkubationsansatz wurde wie folgt pipettiert:

- 0,1 ml der gelösten Prüfsubstanz in der jeweiligen Konzentration (s. 2.1.)
bzw. Aqua dest. für die Leeransätze
- 0,7 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4
- 0,1 ml 0,5 mM Fe^{2+} -Lösung ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$)
- 0,1 ml verdünnte Mikrosomensuspension
- 0,1 ml 0,5 mM NADPH in 0,1 M Na-Phosphatpuffer

Durch die Zugabe von NADPH wurde die Reaktion gestartet. Danach erfolgte die Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C . Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 1,0 ml 30%-iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Für die Farbentwicklung wurde den Proben 1,0 ml frische 0,67%-ige Thiobarbitursäure (TBA) zugesetzt und diese dann 15 Minuten lang in verschlossenen Röhrchen im Wasserbad gekocht. Abschließend erfolgte

die Zentrifugation der Probenröhrchen bei 5700 U/ min für 5 Minuten in einer Megafuge 10 der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland). Der sich dabei bildende rote klare Überstand wurde abpipettiert. Die Messung dieses Überstandes am Spektralphotometer vom Typ Spekol 11 der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland) erfolgte bei 536 nm gegen Wasser bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm (BUEGE und AUST 1978).

Für jede Mikrosomensuspension wurde eine Kontrolle und ein Leerwert mitgeführt; dazu wurde bereits vor Pipettierung der Mikrosomensuspension die 30%-ige TCA hinzugegeben und diese Proben wurden anschließend nicht im Wasserbad inkubiert. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen vorgenommen.

Der Umsatz wird in nmol TBARS / (mg Protein x min) angegeben und folgendermaßen berechnet:

$$c_{\text{TBARS}} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d \times t \times P/V} \quad (2)$$

c_{TBARS} = Oxidaseaktivität, angegeben in nmol TBARS / (mg Protein x min)

ΔE = Extinktionsdifferenz = Extinktion Inkubationsansatz - Extinktion Leerwert

ε = molarer Extinktionskoeffizient = $1,56 \times 10^5 \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

d = Schichtdicke = 1 cm

t = Inkubationszeit = 10 Minuten

P = Proteingehalt = 0,25 mg /Testansatz

V = Meßvolumen = 3 ml

2.4.2. Bestimmung der H₂O₂-Bildung in Lebermikrosomen

Bei der Anwendung dieser Methode entsteht in Anwesenheit vom Cyt P450 Wasserstoffperoxid. H₂O₂ bildet mit Ferroammoniumsulfat und Kaliumthiocyanat einen roten Farbstoff (Ferrithiocyanat). Das entstandene Reaktionsprodukt ist ein Maß für die gebildete H₂O₂-Menge und gibt damit Auskunft über den Einfluß der Untersuchungssubstanzen auf die Radikalbildung.

Zur Bestimmung der H₂O₂-Bildung wurden in den Mikrosomenfraktionen durch Zugabe von 0,1 M Na-Phosphatpuffer eine Proteinkonzentration von 10-15 mg Protein / ml eingestellt.

Der Inkubationsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

- 0,10 ml der gelösten Prüfsubstanz in der jeweiligen Endkonzentration (s. 2.1.)
bzw. Aqua dest. für die Kontroll- und Leerwert-Ansätze
- 1,00 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
- 0,10 ml 150 mM Kaliumchlorid in Aqua dest.
- 0,10 ml 10 mM Magnesiumchlorid in Aqua dest.
- 0,05 ml 0,5 mM Natriumacid in Aqua dest.
- 0,10 ml verdünnte Mikrosomensuspension
- 0,10 ml 0,5 mM NADPH in Aqua dest.

Durch die Zugabe von NADPH wurde die Reaktion gestartet. Danach erfolgte die Inkubation im Schüttelwasserbad (30°C). Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit 2,5 ml eisgekühlter 3%-iger TCA gestoppt und alle Probenröhrchen bei +4°C für 20 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Im Anschluß erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation der Probenröhrchen bei 5700 U/min mit einer Megafuge 10 der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland). Von dem sich dabei gebildeten klaren Überstand wurden jeweils 2,5 ml in ein neues Reagenzglas abpipettiert. Zu jeder Probe wurden nun noch 0,5 ml 10 mM Ferroammoniumsulfat und 0,2 ml 2,5 mM Kaliumthiocyanat gegeben. Abschließend wurden alle Röhrchen nochmals für 10 Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Die Messung der Proben am Spektralphotometer des Typs Spekol 11 der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland) erfolgte bei 480 nm gegen Wasser bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm (HILDEBRANDT et al. 1978).

Für jede Mikrosomensuspension wurde eine Kontrolle und ein Leerwert mitgeführt: dazu wurde bereits vor Pipettierung der Mikrosomensuspension die 3%-ige TCA hinzugegeben und diese Proben wurden anschließend nicht im Wasserbad inkubiert. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen.

Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Eichkurve mitgeführt. Dazu wurde der H₂O₂-Gehalt einer 30%igen H₂O₂-Stammlösung ermittelt. Der genaue Wasserstoffperoxidgehalt läßt sich durch Titration mit 0,1 N Kaliumpermanganat-Lösung im sauren Medium bestimmen, indem 5 ml Stammlösung und 2 ml 20%ige Schwefelsäure tropfenweise mit 0,1 N KMnO₄ bis zu einem zart rosa Farbumschlag versetzt wird. Für die Eichkurve wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Die Eichwerte enthielten, ebenso wie der Inkubationsansatz, alle Reagenzien, aber vor Zugabe der jeweiligen H₂O₂-Konzentrationen wurde die Reaktion durch Zusatz von TCA beendet.

Die während der Inkubationszeit von 20 Minuten gebildete Menge an Wasserstoffperoxid wird mit Hilfe der Eichkurve und bezogen den aktuellen Proteingehalt im Ansatz folgendermaßen berechnet:

$$c_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{\Delta E \times F_{\text{EK}}}{t \times P} \quad (3)$$

$c_{\text{H}_2\text{O}_2}$ = Oxidaseaktivität, angegeben in nmol H_2O_2 / (mg Protein x min)

ΔE = Extinktionsdifferenz = Extinktion Inkubationsansatz - Extinktion Leerwert

F_{EK} = Faktor Eichkurve = Mittelwert der Quotienten aus eingesetzter H_2O_2 -Konzentration und ΔE der Eichwerte

t = Inkubationszeit = 20 Minuten

P = Proteingehalt = 10 - 15 mg/ml

2.4.3. Luminol- und Lucigenin-verstärkte mikrosomale Chemilumineszenz

Mit Hilfe der Chemilumineszenzmessung (CL) ist es möglich, bestimmte oxidative Funktionen zu erfassen, wobei das Prinzip auf der Registrierung von Lichtimpulsen basiert, die während der Umwandlung von chemischer Energie in Lichtenergie entstehen. Die Messung der CL wird bei der Bestimmung und Charakterisierung von im Cyt P450-System gebildeten Radikalen angewendet (MÜLLER-PEDDINGHAUS und WURL 1987). Beim Zurückfallen von δ -Singulett-Sauerstoff in den Grundzustand kann ein Lichtimpuls entstehen. Die durch das Cyt P450 produzierten Radikale führen zudem bei Luminol (Lm) bzw. Lucigenin (Lc) zu chemischen Prozessen, bei denen diese in Verbindungen mit niedrigerem Energieniveau umgewandelt werden und die freiwerdende Energie in Form eines Photons abgegeben wird (FAULKNER und FRIDOVICH 1993, MÜLLER-PEDDINGHAUS und WURL 1987). Durch die Zugabe dieser Verstärker-Substanzen, die während der Reaktion selbst zu Radikalen werden, kann die CL besser sichtbar gemacht werden. Außerdem charakterisieren Lm und Lc unterschiedliche Radikale (FAULKNER und FRIDOVICH 1993, KLINGER et al. 1994, KLINGER et al. 1996). Es wird allerdings in der Literatur kontrovers diskutiert, welche Radikale vor allem mit Lm und welche insbesondere mit Lc nachgewiesen werden können.

2.4.3.1. Luminol-verstärkte Chemilumineszenz

Luminol, ein Aminophthalsäuredianion, reagiert vorzugsweise mit H_2O_2 (MÜLLER-PEDDINGHAUS und WURL 1987), aber auch mit O_2^\bullet oder OH^\bullet (FAULKNER und FRIDOVICH 1993). Der erste Reaktionsschritt in der Elektronentransportkette ist die Oxidation des Lm-Anions zum Radikal (KLINGER et al. 1994).

Zur Bestimmung der Lm-CL wurde in die Zentrifugenröhrchen folgendes pipettiert:

- 0,1 ml der gelösten Substanz in der entsprechenden Verdünnung (s. 2.1.)
- 1,2 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4
- 0,2 ml 0,5 mM Fe^{2+} -Lösung ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$)
- 0,2 ml 0,3 mM Luminol
- 0,2 ml Mikrosomensuspension (0,5 mg Protein/ml) bzw.
Na-Phosphatpuffer für den Leerwert

Die Reagenzröhrchen wurden in das Meßgerät Autolumat LB 953 der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland) gestellt. Der Reaktionsstart erfolgte automatisch durch die Injektion von 0,3 ml 0,1 mM NADPH, das in 0,1 M Na-Phosphatpuffer gelöst war.

Die Lichtimpulse wurden durch das Meßgerät erfaßt und mit Hilfe des Computers und einer speziellen Software der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland) ausgewertet. Die Anzahl der registrierten Lichtimpulse dient als Maß für die entstandenen Radikale und wird nach folgender Formel berechnet, wobei sich das Ergebnis auf 1 Minute und 1 mg Protein bezieht:

$$\text{CPM /mg Protein} = \frac{P_W - L_W}{P \times t} \quad (4)$$

CPM = counts per minute = Lichtimpulse/Minute

P_W = Anzahl der Lichtimpulse über 3,5 Minuten bei den Probenwerten

L_W = Anzahl der Lichtimpulse über 3,5 Minuten bei den Leerwerten

t = Meßzeit = 3,5 Minuten

P = Proteingehalt = 0,5 mg/Testansatz

2.4.3.2. Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz

Lucigenin, bestehend aus zwei Molekülen Methylacridon, reagiert vorzugsweise mit $O_2^{\bullet-}$ -Radikalen (MÜLLER-PEDDINGHAUS und WURL 1987). Der erste Schritt in der Elektronentransportkette beim Lc ist im Gegensatz zum Lm ein Reduktionsschritt (FAULKNER und FRIDOVICH 1993). Es werden aber mit der Lc-CL auch OH^{\bullet} bzw. organische Radikale nachgewiesen (KLINGER et al. 1994).

Zur Bestimmung der Lc-CL wurden Zentrifugenröhrchen wie folgt vorbereitet:

- 0,1 ml der gelösten Substanz in der entsprechenden Verdünnung (s. 2.1.)
- 1,2 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4
- 0,2 ml 12,5 μ M Fe^{2+} -Lösung ($FeSO_4 \times 7 H_2O$)
- 0,2 ml 5 mM Lucigenin
- 0,2 ml Mikrosomensuspension (0,5 mg Protein/ml) bzw.

Na-Phosphatpuffer für den Leerwert

Die Proben wurden in den Meßapparat, ein Autolumat LB 953 der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland), gestellt, wo automatisch die Einspritzung von 0,3 ml 0,1 mM NADPH-Lösung zum Starten der Reaktion erfolgte. Mit Hilfe eines speziell entwickelten Programmes der Firma Berthold wurden die Proben gemessen, wobei die Meßdauer 3,5 Minuten und die Meßtemperatur 37°C betrug. Die bei der Reaktion entstehende Lichtenergie wurde vom Photomultiplier erfaßt und vom Computer ausgewertet. Zur Auswertung der Probe wurde der Leerwert vom Probenwert subtrahiert und das Ergebnis auf 1 Minute und 1 mg Protein bezogen (siehe Formel 4).

2.5. Bestimmung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz im Rattenvollblut

Durch den Einsatz dieser Methode konnte der Einfluß der Testsubstanzen auf die Radikalbildung bei der Phagozytose ermittelt werden. Die so erfaßten Radikale werden von der NADPH-Oxidase generiert und sind in ihrer Entstehung unabhängig vom Cyt P450-Zyklus. Die Messungen wurden in Anlehnung an die Methode von ALLEN (1986) durchgeführt. Dabei wurden die Leukozyten im Rattenblut mit serumopsoniertem Zymosan zur Phagozytose stimuliert. Durch die Opsonierung (Anlagerung von Plasmabestandteilen an körperfremde antigene Substanzen) wird die Elimination der

Leukozyten durch Phagozytose günstig beeinflusst. Die bei der Phagozytose entstandenen Radikale verursachten Photonenemissionen, welche mit dem Meßgerät Autolumat LB 953 der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland) erfaßt wurden.

Die für den Versuch benötigten Pufferlösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Puffer für die Blutverdünnung

4,000 g NaCl

0,100 g KCl

0,362 g KH_2PO_4

0,570 g Na_2HPO_4

0,500 g D-Glucose

0,500 g Rinderserumalbumin

Puffer für die Messung

3,800 g NaCl

0,165 g KCl

0,500 g Eagle-Medium ohne Phenolrot

0,500 g D-Glucose

0,500 g Rinderserumalbumin

2,500 ml 0,1 M MgCl_2

(0,66 g/100 ml Aqua dest.)

- beide Puffer mit Aqua dest. auf jeweils 400 ml auffüllen
- bei beiden Puffern pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf 7,3 einstellen
- beide Puffer mit Aqua dest. auf je 500 ml auffüllen

Das Vollblut der Ratten wurde mit Heparin versetzt (1ml Vollblut + 5000 I.E. Heparin-Natrium der Firma B. Braun Melsungen AG [Melsungen, Deutschland]) und sofort nach der Gewinnung mit dem o. g. Puffer zur Blutverdünnung 1:500 verdünnt.

Alle Meßansätze enthielten folgende Reagenzien:

- 0,10 ml der zu untersuchenden Substanz in der entsprechenden Konzentration
- 1,75 ml Puffer (für die Messung)
- 0,10 ml 150 μM Luminol
- 0,05 ml verdünntes Blut
- 0,10 ml opsoniertes Zymosan (3 mg / ml)

Der Leeransatz enthielt kein Zymosan. Das fehlende Volumen wurde durch Meßpuffer ausgeglichen.

Nach dem Mischen wurden die Proben sofort in das Meßgerät gestellt und 90 Minuten bei 37°C gemessen. Die Ergebnisse werden in „relativen Lichteinheiten“ (relative light units = RLU) angegeben und auf 10^6 Leukozyten bezogen.

2.6. Bestimmung der Radikalbildung mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System

Mit dem Einsatz dieser Meßmethode konnte die Wirkung der Testsubstanzen auf das Xanthinoxidase (XO)-System untersucht werden. Damit kam ein weiterer in vitro-Modellversuch zur Anwendung, bei dem, wie auch bei der CL Messung im Rattenvollblut, die während der Reaktion entstandenen Radikale unabhängig vom Cyt P450-Zyklus erfaßt werden.

Die Xanthinoxidase und molekularer Sauerstoff bilden aus Hypoxanthin das Superoxid-Radikal-Anion, das Hydroxyl-Radikal und Xanthin (ROST et al. 1998-a). Die bei der Reaktion erstandenen Radikale erzeugen die bereits erwähnten Photonenemissionen, die mit dem Meßgerät Autolumat LB 953 der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland) registriert wurden.

Für die Meßansätze wurden folgende Reagenzien pipettiert:

- 0,1 ml der zu untersuchenden Substanz in der entsprechenden Konzentration
- 1,1 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer
- 0,2 ml 5,0 µM Lucigenin
- 0,2 ml 12,5 µM Fe^{2+} -Lösung ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)
- 0,2 ml 4,2 mM Xanthinoxidase
- 0,3 ml 0,2 mM Hypoxanthin

Durch die Zugabe des Hypoxanthins wurde die Reaktion gestartet. Die Messungen erfolgten mit einem speziell entwickeltem Kinetik-Programm der Firma Berthold bei Raumtemperatur (25°C). Die Meßdauer betrug 15 Sekunden. Kontrollwerte, ohne Substanz, und Leerwerte, ohne Xanthinoxidase, wurden bei jeder Versuchsreihe mitgeführt.

2.7. Spektrales Bindungsverhalten an das Cytochrom P450

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung von typischen Extinktionsmaxima und -minima im Differenzspektrum in einem Wellenbereich von 350 nm bis 450 nm. Es kann davon ausgegangen werden, daß eine Mikrosomensuspension, in der sich eine an das Cyt

P450 bindende Substanz befindet, andere Extinktionsmaxima und -minima hat als eine Suspension, in der diese Prüfsubstanz nicht enthalten ist. Beide Suspensionen werden in einem Messbereich von 350 nm bis 450 nm gegeneinander gemessen, womit man ein Differenzspektrum mit typischen Extinktionsmaxima und -minima erhält (MÜLLER 1976, SCHENKMANN et al. 1967-a).

Hexobarbital und Anilin sind charakteristische Beispiele für solche sich bindenden Substanzen. Bei beiden Stoffen ergeben sich zwei typische Differenzspektren. Aus diesem Grunde wurden beide Substanzen bei den Versuchen stets als Kontrollen mitgeführt. Hexobarbital hat sein Extinktionsmaximum bei 385 nm und sein Extinktionsminimum bei 425 nm. Dieser typische Kurvenverlauf wird als Typ I bezeichnet. Anilin weist sein Extinktionsmaximum bei 427 nm und sein Extinktionsminimum bei 392 nm auf. Durch diesen Kurvenverlauf wird der Typ II im Bindungsverhalten gekennzeichnet. Insgesamt gibt es in Lebermikrosomen drei Kategorien von Differenzspektren: Typ I, Typ II und den modifizierten Typ II (auch als inverser Typ I bezeichnet) (SCHENKMANN et al. 1967-b).

Zur Beurteilung des Bindungsverhaltens der Testsubstanzen an Cyt P450 in einem Wellenlängenbereich zwischen 350 nm und 450 nm wurde wie folgt vorgegangen: Die Kontrollsubstanzen Hexobarbital und Anilin sowie alle Testsubstanzen wurden in einer Endkonzentration von 10^{-3} M untersucht.

In die Probenröhrchen wurde für die Hauptwerte (HW)

- 0,1 ml Testsubstanz (in Methanol gelöst und verdampft),
- 0,5 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) und
- 1,0 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt 7,5 mg/ml)

oder für wasserlösliche Substanzen:

- 0,1 ml Testsubstanz in wässriger Lösung,
- 0,4 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) und
- 1,0 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt 7,5 mg/ml) pipettiert.

Für die Bestimmung des Leerwertes (LW) wurden

- 0,5 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) und
- 1,0 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt 7,5 mg/ml) pipettiert.

Die Messungen erfolgten im Spektralphotometer Unicam UV VIS 4 der Firma Spectronic (Cambridge, England).

Bei farbigen Substanzen, die ihre Wellenlängenmaxima im Bereich zwischen 350 nm und 450 nm haben, wurde zur Bestimmung der Bindung dieser Prüfsubstanzen an das Cyt P450 die sogenannte 4-Küvetten-Methode angewandt.

In den Hauptstrahlengang kamen hintereinander:

1. Küvette mit HW
2. Küvette mit 1,5 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4

In den Vergleichsstrahlengang kamen hintereinander:

1. Küvette mit LW
2. Küvette mit 1,4 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4
 0,1 ml der gelösten zu untersuchenden Substanz

Die eingesetzten Küvetten hatten eine Schichtdicke von 0,5 cm. Die Messungen erfolgten mit dem o. g. Spektralphotometer Unicam UV VIS 4 der Firma Spectronic (Cambridge, England). Zusätzlich wurde ein Dunkelkammervorsatz verwendet. Mit dem Meßgerät konnten die Differenzspektren zwischen den Wellenlängen von 350 nm bis 450 nm aufgenommen werden.

2.8. Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Sämtliche Versuche wurden mit einer Anzahl von $n = 6$ durchgeführt. Die Meßwerte in den graphischen Darstellungen werden als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei den Versuchen erfolgte innerhalb einer Versuchsserie die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den mit Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen versetzten Rattenlebermikrosomen und den Kontrollen. Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem gepaarten t-Test nach Student für zweiseitige Fragestellungen durchgeführt. Die Werte der Untersuchungssubstanzen wurden mit den jeweiligen mitgeführten Kontrollen des Tages verglichen, d. h. es kann zu signifikanten Unterschieden auch dann kommen, wenn die Werte jeweils immer (wenn auch oftmals nur geringfügig) unter den Kontrollen liegen und somit die SEM sich überschneiden. Die Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ als statistisch signifikant betrachtet (CAVALLI-SFORZA 1969).

In den Abbildungen wurden die Signifikanzen gegenüber den Kontrollen mit einem Stern bei signifikanter Reduktion, und mit einem Pluszeichen bei signifikanter Steigerung, gekennzeichnet. Bei den Diagrammen sind auf der Abszisse jeweils die Kontrolle (c) und die untersuchten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Die Ordinate zeigt die Aktivität der Prüfsubstanzen in Prozent im Bezug zur Kontrolle, die gleich 100% gesetzt wurde. Dies erfolgte auf Grund der von Tag zu Tag doch relativ großen Schwankungsbreite der Kontrollen, so daß zur besseren Vergleichbarkeit lediglich die relativen Änderungen dargestellt werden. Auf die Darstellung nicht signifikanter Ergebnisse wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit verzichtet.

Die Bestimmung der spektralen Bindung der Prüfsubstanzen an Cyt P450 mittels Messung der Differenzspektren wurde nur graphisch ausgewertet.

3. Versuchsergebnisse

3.1. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Oxidase-Funktion des Cytochrom P450

An Hand der Modellreaktionen NADPH / Fe^{2+} -stimulierte Lipidperoxidation, NADPH-stimulierte H_2O_2 -Bildung, sowie Luminol- und Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Pflanzen-Phenole als Radikalfänger wirksam werden oder aber den oxidativen Zyklus unterbrechen können.

Für Radikalfängereigenschaften einer Substanz würde ein niedriges Reaktionsergebnis, d. h. beispielsweise wenig H_2O_2 -Bildung oder wenige Lichtimpulse, sprechen. Diese Substanz hätte somit die entstandenen Radikale neutralisiert oder die Oxidase-Funktion gehemmt.

3.1.1. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die stimulierte Lipidperoxidation

Mit Ausnahme von Ascorbinsäure, Flavon und β -Karotin zeigten alle untersuchten Substanzen einen Hemmeffekt auf die LPO (Abb. 5a bis 5d). Damit wird deutlich, daß diese Stoffe die Bildung von freien Radikalen reduzieren können. Die stärksten Effekte konnten bei Curcumin und Rutin beobachtet werden. Etwas geringere Effekte bei der Hemmung der LPO wurden bei Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Trolox, Catechin, Gallussäure, 3-Hydroxyflavon, Naringenin, Chlorogensäure, Daidzein, Chrysin, und Apigenin gemessen. Eine nur geringfügige Hemmung der LPO zeigten die Versuche mit den Substanzen Kaffeesäure, Genistein, Harnsäure, 5-Hydroxyflavon und Ferulasäure. Für β -Karotin konnte eine signifikante Erhöhung der LPO gemessen werden. Ascorbinsäure zeigte bei Konzentrationen von 0,01 und 0,1 mM eine steigernde Wirkung auf die LPO, die aber bei einer Konzentration von 1 mM nicht mehr nachweisbar war. Eine Sonderstellung nahm Flavon ein. Diese Substanz führte in den beiden niedrigsten Verdünnungsstufen (0,001 und 0,01 mM) zu einer Steigerung und bei 0,1 und 1 mM zu einer Hemmung der LPO.

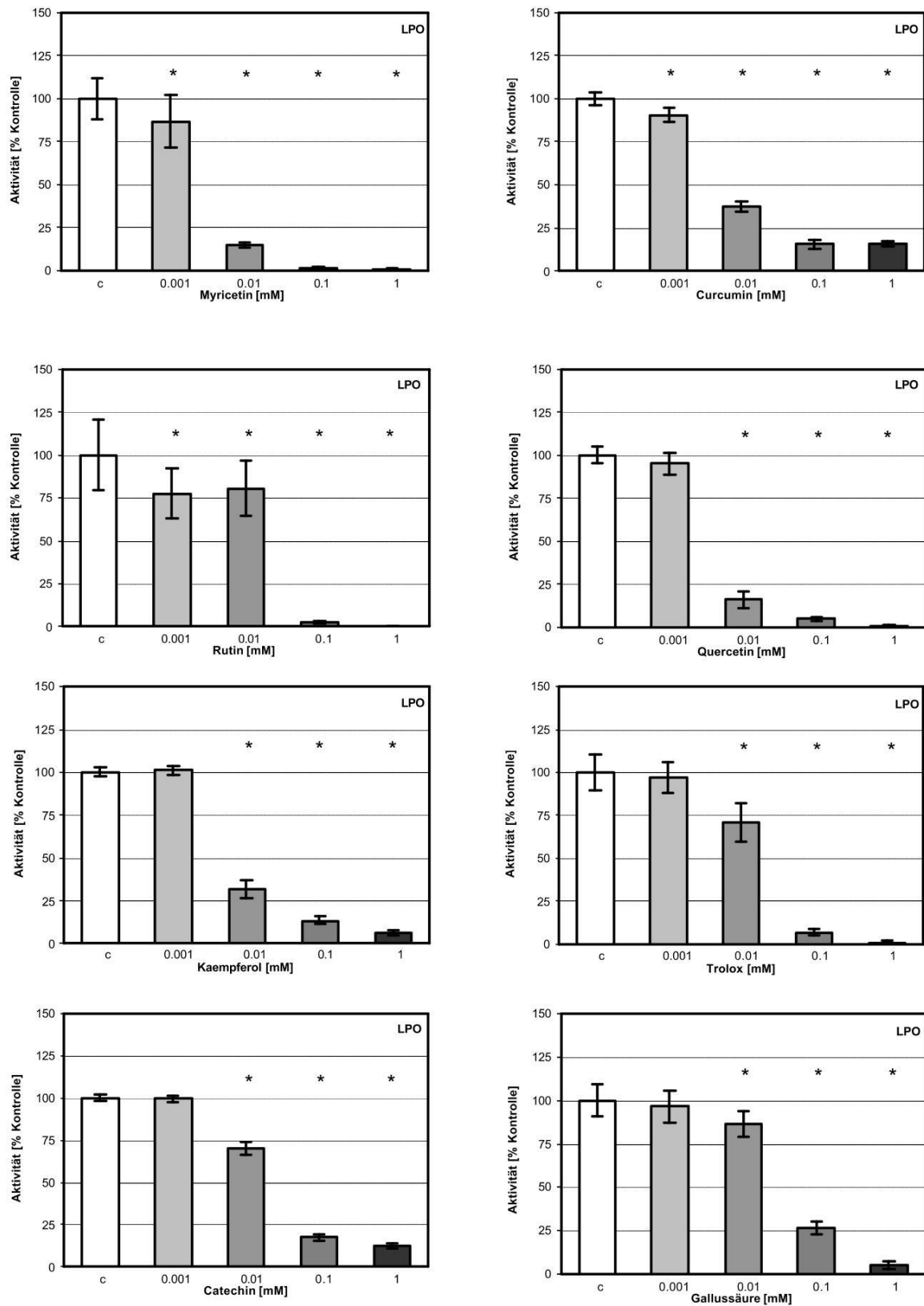


Abb. 5a: Ergebnisse der Substanzen, die die LPO reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

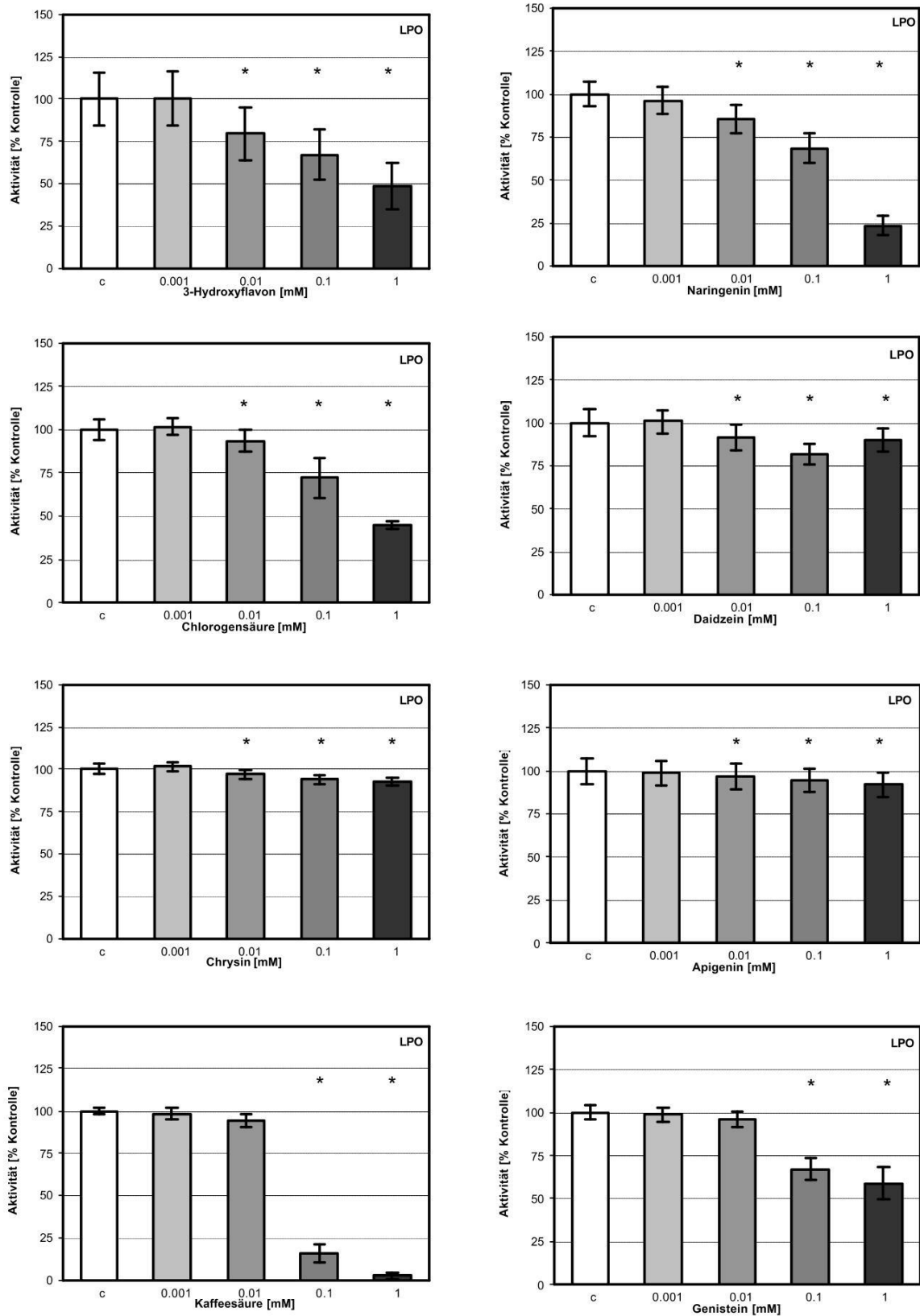


Abb. 5b: Ergebnisse der Substanzen, die die LPO reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

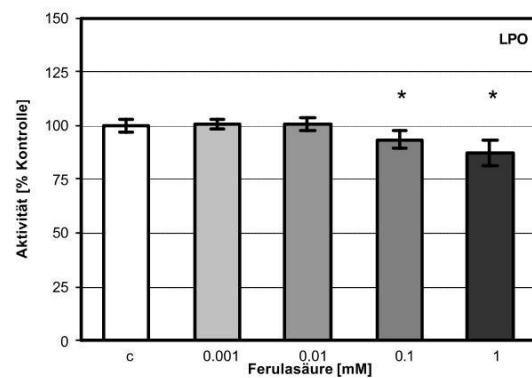
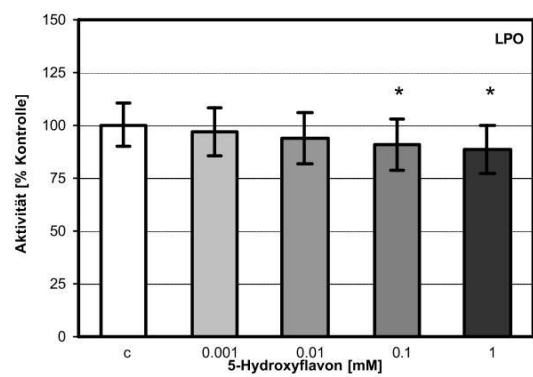
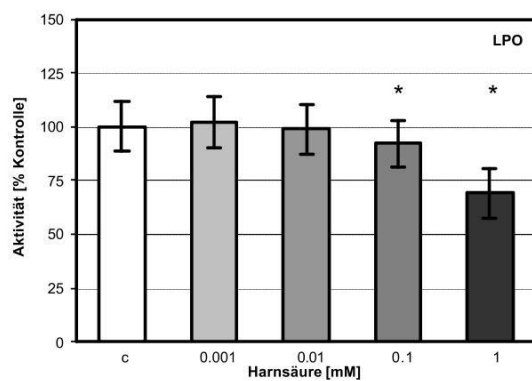


Abb. 5c: Ergebnisse der Substanzen, die die LPO reduzieren;
arithmetischen Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

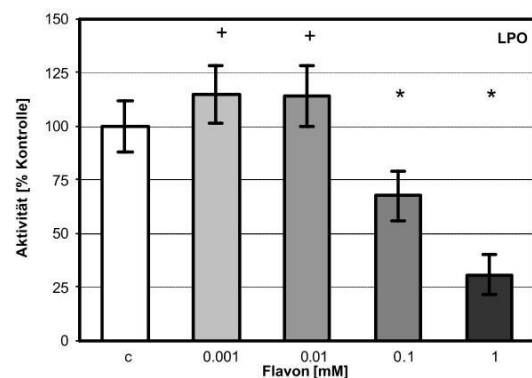
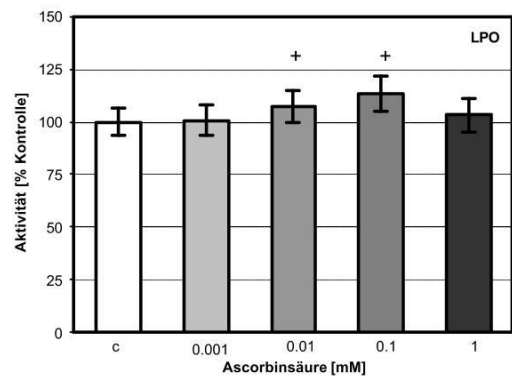
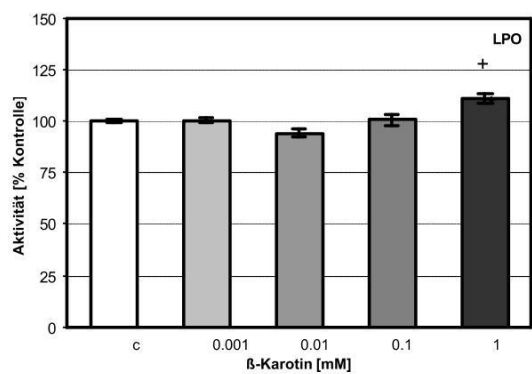


Abb. 5d: Ergebnisse der Substanzen, die die LPO nicht reduzieren;
arithmetischen Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, +/* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

3.1.2. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die H₂O₂-Bildung

Die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die H₂O₂-Bildung war sehr unterschiedlich (Abb. 6a bis 6c). Es konnten nur bei Chrysin stark hemmende Einflüsse beobachtet werden; bei Genistein, Naringenin und Flavon war bis zur Konzentration von 0,01 mM eine signifikante Verminderung der H₂O₂-Bildung meßbar. Eine etwas geringere Hemmung konnte mit Ascorbinsäure, Trolox, Quercetin, Daidzein und β -Karotin gezeigt werden. Noch geringer war der Effekt bei Apigenin und 5-Hydroxyflavon.

Ferulasäure, Kaempferol und 3-Hydroxyflavon waren in diesem Versuchsansatz wirkungslos. Auf die Darstellung dieser nicht signifikanten Reaktionsergebnisse wurde verzichtet.

Eine Zunahme der H₂O₂-Bildung bewirkten Rutin und Curcumin bis 0,1 mM sowie Kaffeesäure, Harnsäure, Catechin, Chlorogensäure und Gallussäure noch bis zu Konzentrationen von 0,01 mM. Eine Ausnahme stellte in diesem Versuch Myricetin dar: in einer Konzentration von 0,01 mM wurde die H₂O₂-Bildung gehemmt, wogegen aber in Konzentrationen von 0,1 und 1 mM eine signifikante Steigerung gemessen wurde.

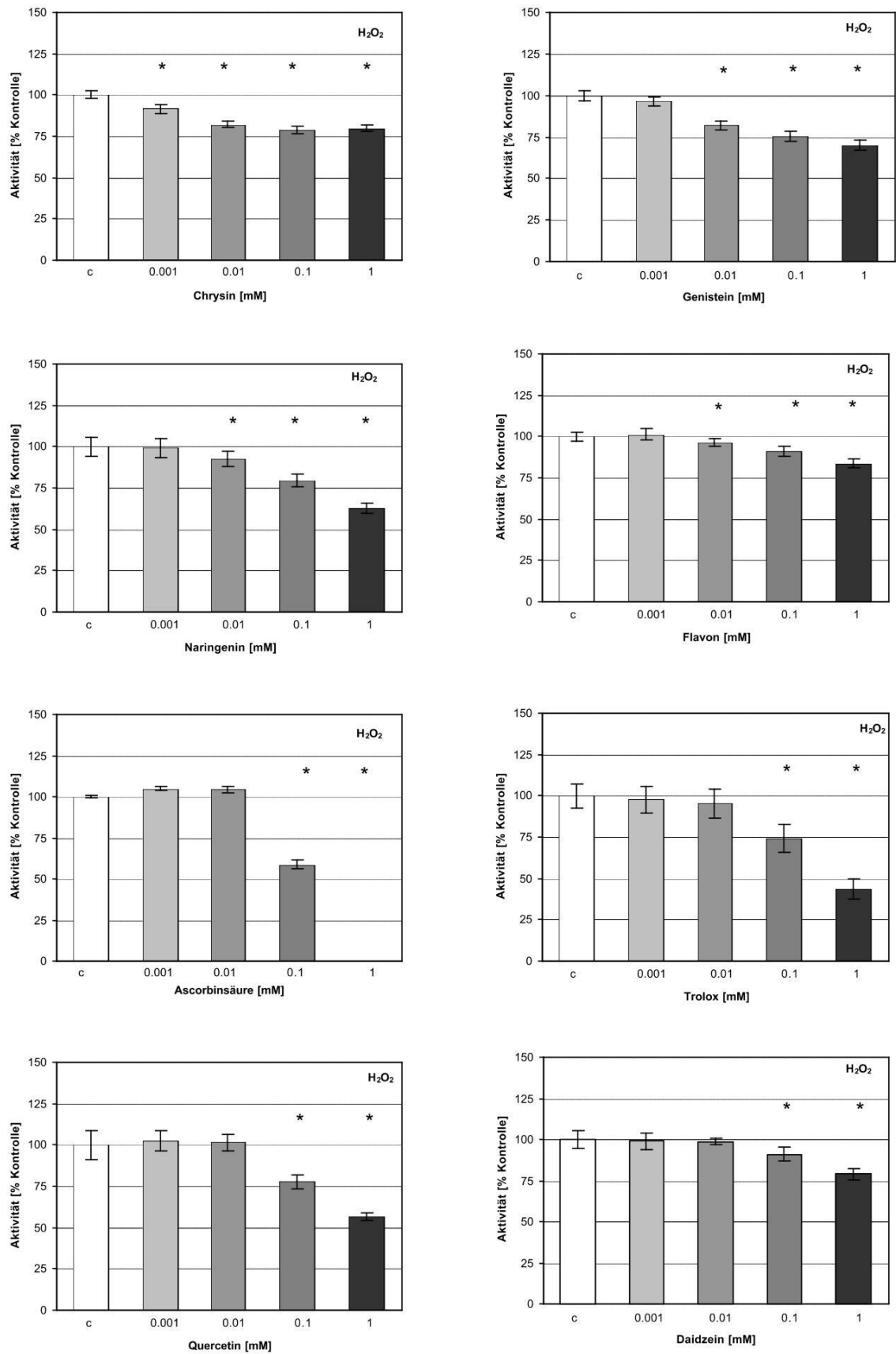


Abb. 6a: Ergebnisse der Substanzen, die die H_2O_2 -Bildung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

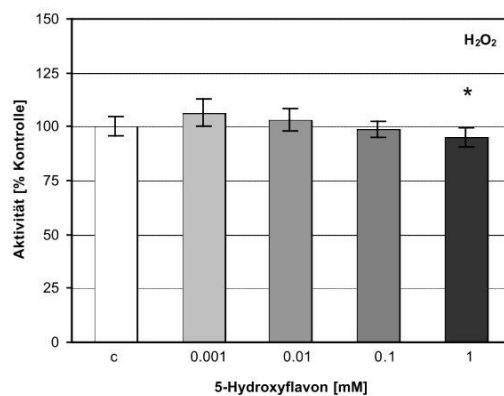
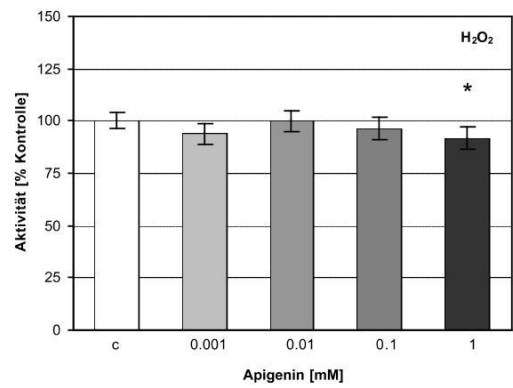
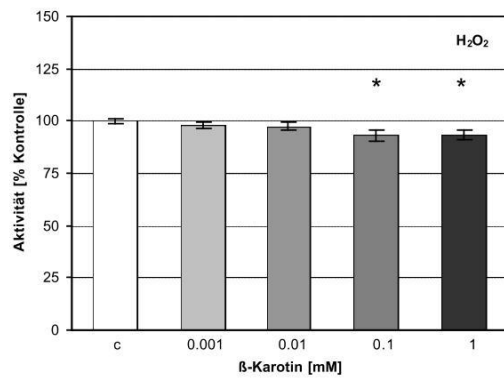


Abb. 6b: Ergebnisse der Substanzen, die die H_2O_2 -Bildung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

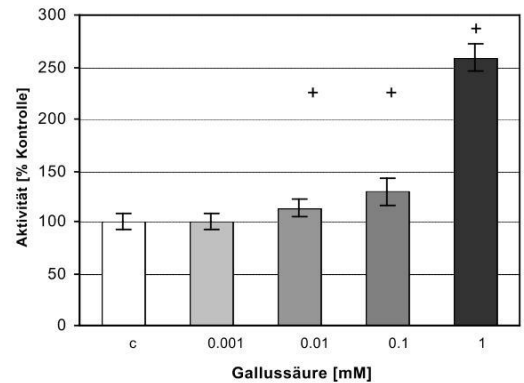
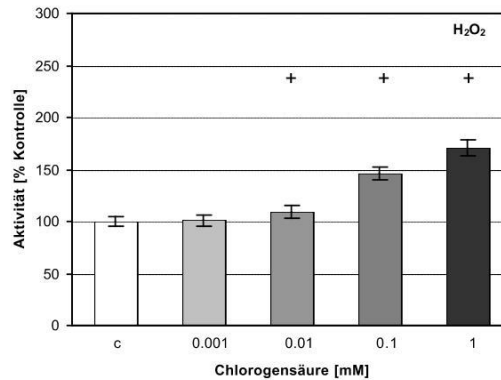
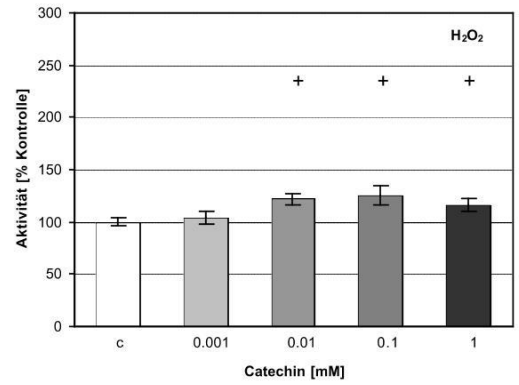
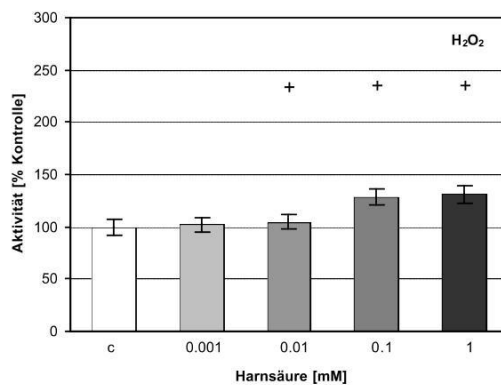
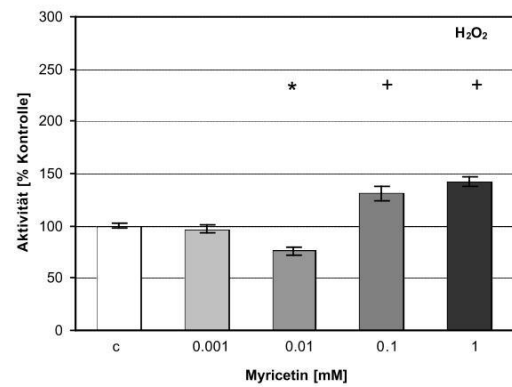
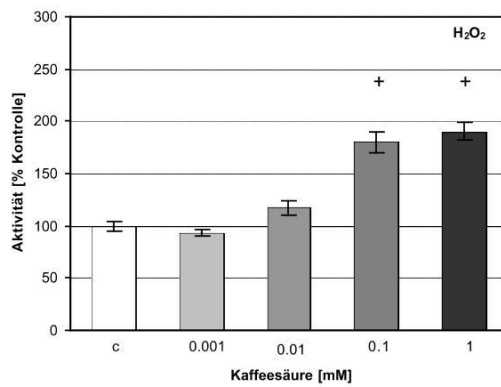
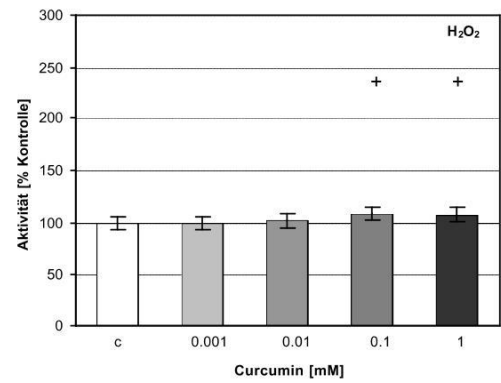
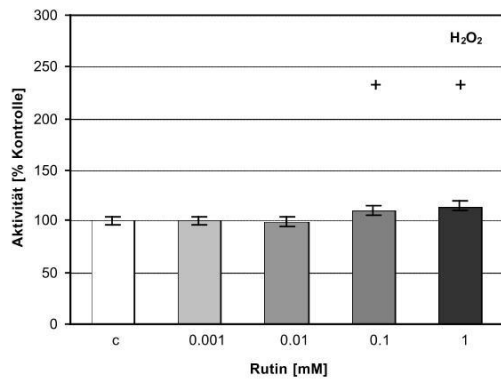


Abb. 6c: Ergebnisse der Substanzen, die die H_2O_2 -Bildung nicht reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, +/* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

3.1.3. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz

Mit Ausnahme von Daidzein und 5-Hydroxyflavon führten alle anderen Prüfsubstanzen zu einer signifikanten Reduktion der Lm-CL (Abb. 7a bis 7c). Auf die Darstellung dieser nicht signifikanten Reaktionsergebnisse der beiden Substanzen wurde daher verzichtet.

Die stärksten Verminderungen der Lm-CL konnten bei Chlorogensäure, Rutin, Trolox, Quercetin, Chrysin und 3-Hydroxyflavon gefunden werden, wobei aber bei den beiden letztgenannten Substanzen, prozentual gesehen, die Hemmungen nur gering waren. Die übrigen Substanzen, wie Catechin, Kaffeesäure, Gallussäure, Harnsäure, Ferulasäure, Kaempferol, Naringenin und Apigenin verursachten signifikante Reduzierungen des Reaktionsproduktes. Etwas geringer, aber trotzdem noch signifikant vermindert, war die Lm-CL nach Zugabe der Substanzen Ascorbinsäure, β -Karotin, Myricetin, Curcumin, Genistein und Flavon.

3.1.4. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz

Auch in diesem Versuchsansatz konnten überwiegend signifikante Reduktionen der Lc-CL durch die zu untersuchenden Substanzen nachgewiesen werden (Abb. 8a bis 8c). Lediglich Genistein und Chrysin zeigten keinen Einfluß auf die Lc-CL, deshalb erfolgt für diese beiden Substanzen keine Darstellung der Ergebnisse.

Sehr starke Hemmungen ergaben die Versuche mit Gallussäure, Quercetin, Myricetin, Rutin, Kaffeesäure, Catechin, Chlorogensäure und Curcumin. Etwas geringer war die Hemmung für Trolox, Kaempferol, Ferulasäure, β -Karotin und Flavon. Die geringsten Effekte zeigten Harnsäure, Naringenin, 3-Hydroxyflavon und Ascorbinsäure, bei denen nur in der höchsten Konzentration von 1 mM eine signifikante Minderung der Lc-CL nachweisbar war. Ein fördernder Effekt auf die Radikalbildung konnte für Daidzein (Konzentration 1 mM) und vor allem für Apigenin festgestellt werden (Abb. 8d). Eine Ausnahme bildete in diesem Modellversuch 5-Hydroxyflavon: es kam einerseits zu einer Steigerung der Lc-CL in den Konzentrationen 0,001 bis 0,1 mM, aber andererseits zu einer Verminderung bei einer Konzentration von 1 mM.

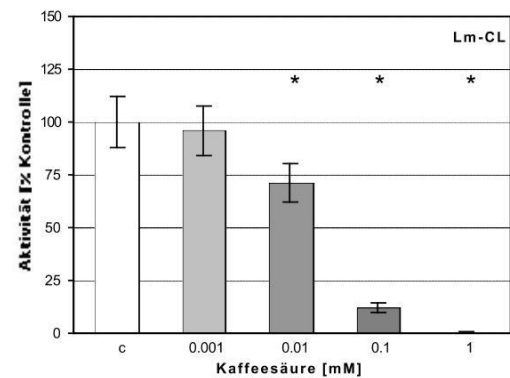
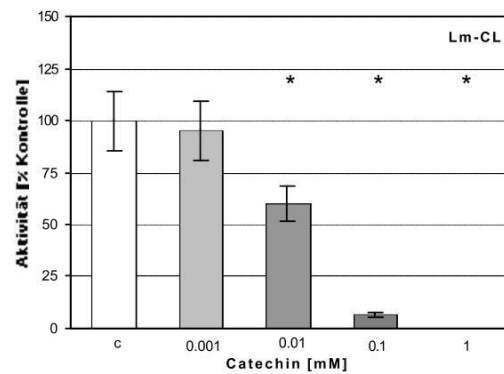
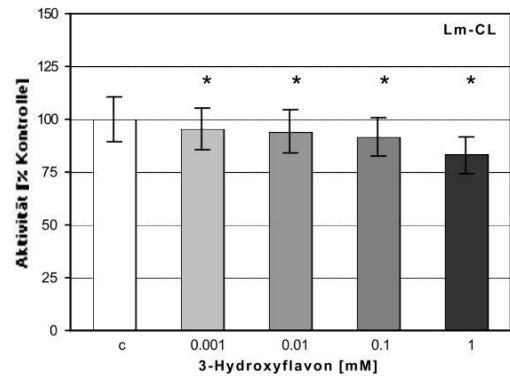
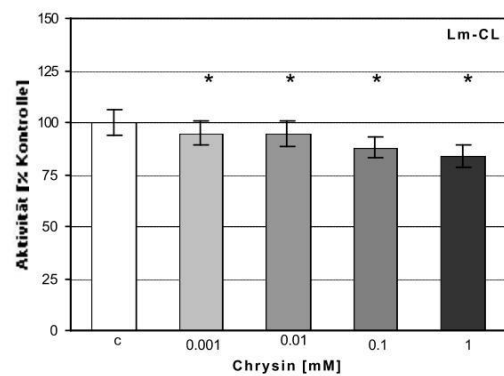
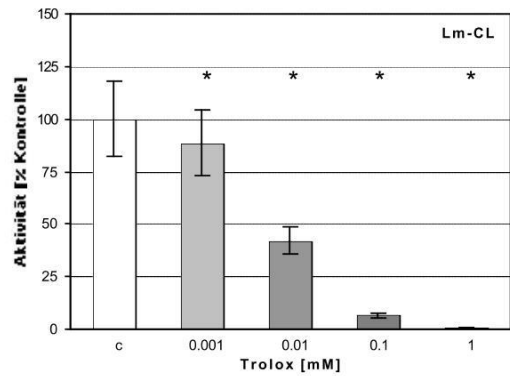
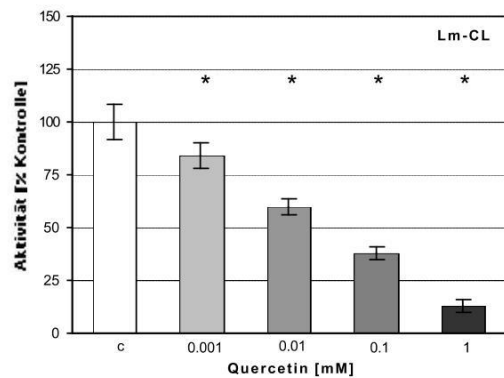
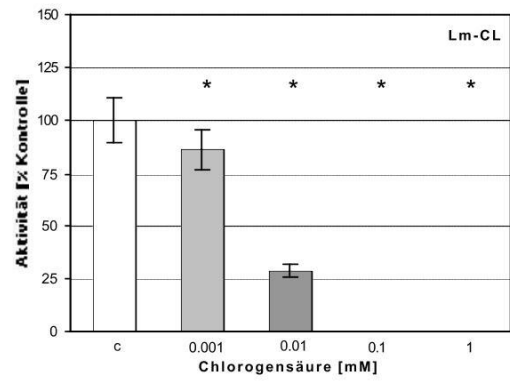
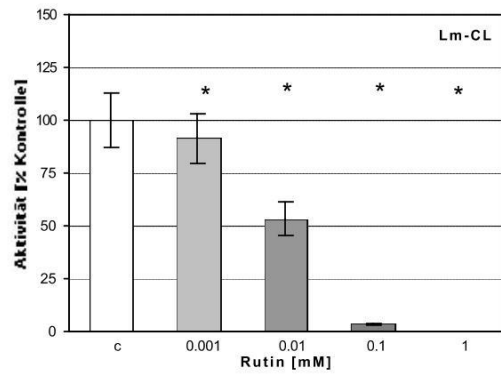


Abb. 7a: Ergebnisse der Substanzen, die die Lm-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

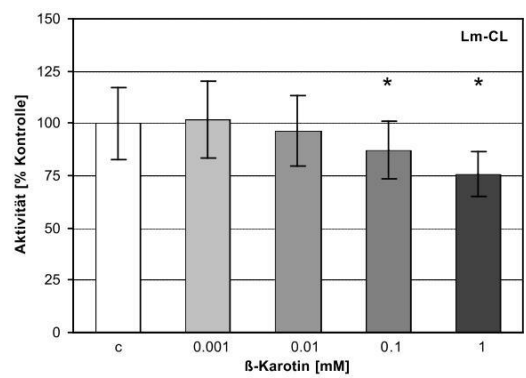
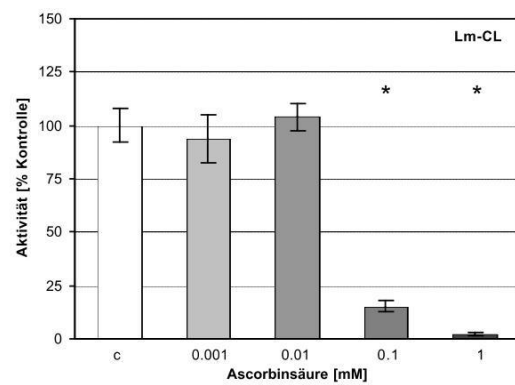
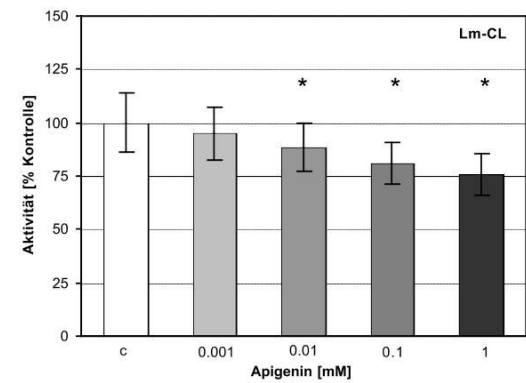
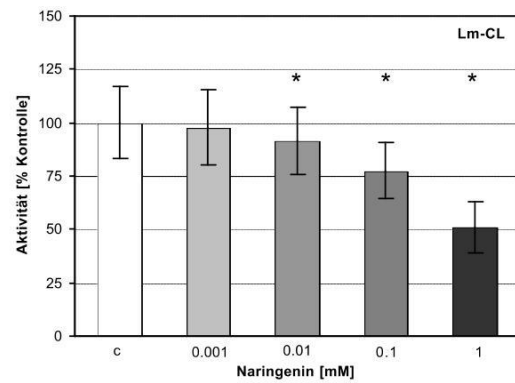
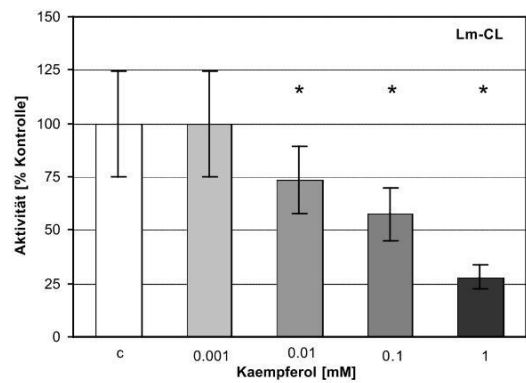
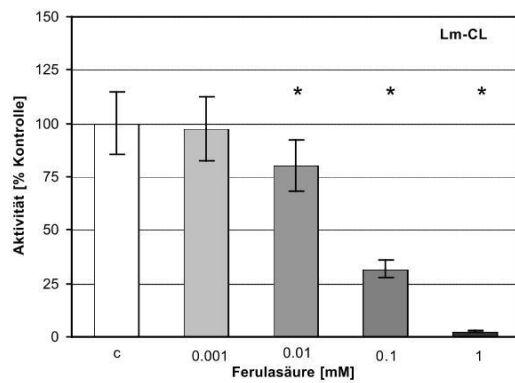
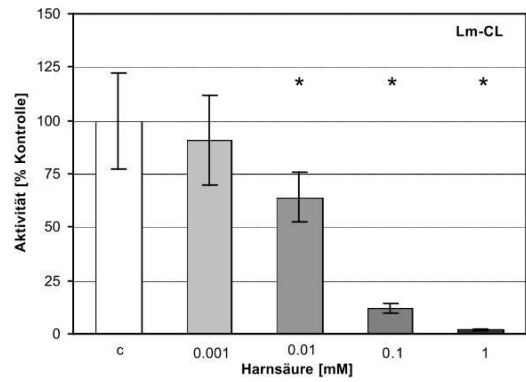
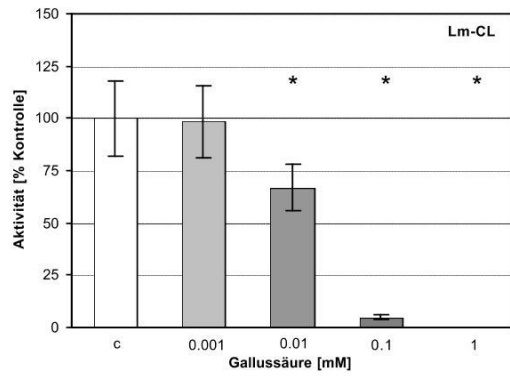


Abb. 7b: Ergebnisse der Substanzen, die die Lm-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

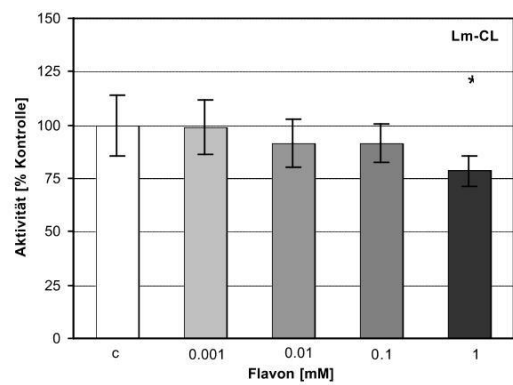
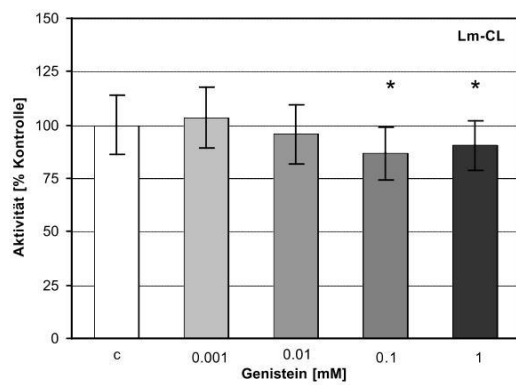
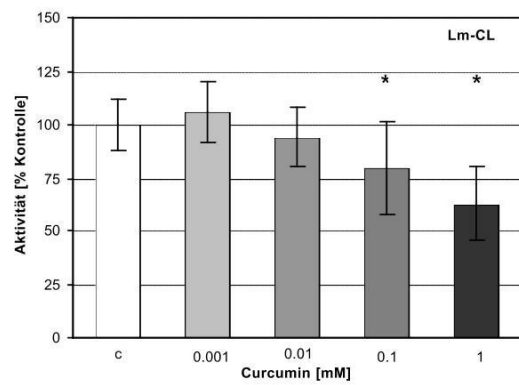
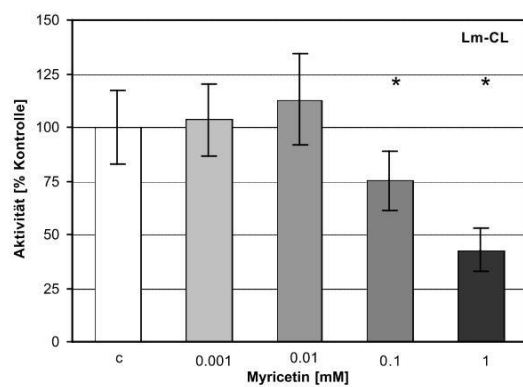


Abb. 7c: Ergebnisse der Substanzen, die die Lm-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

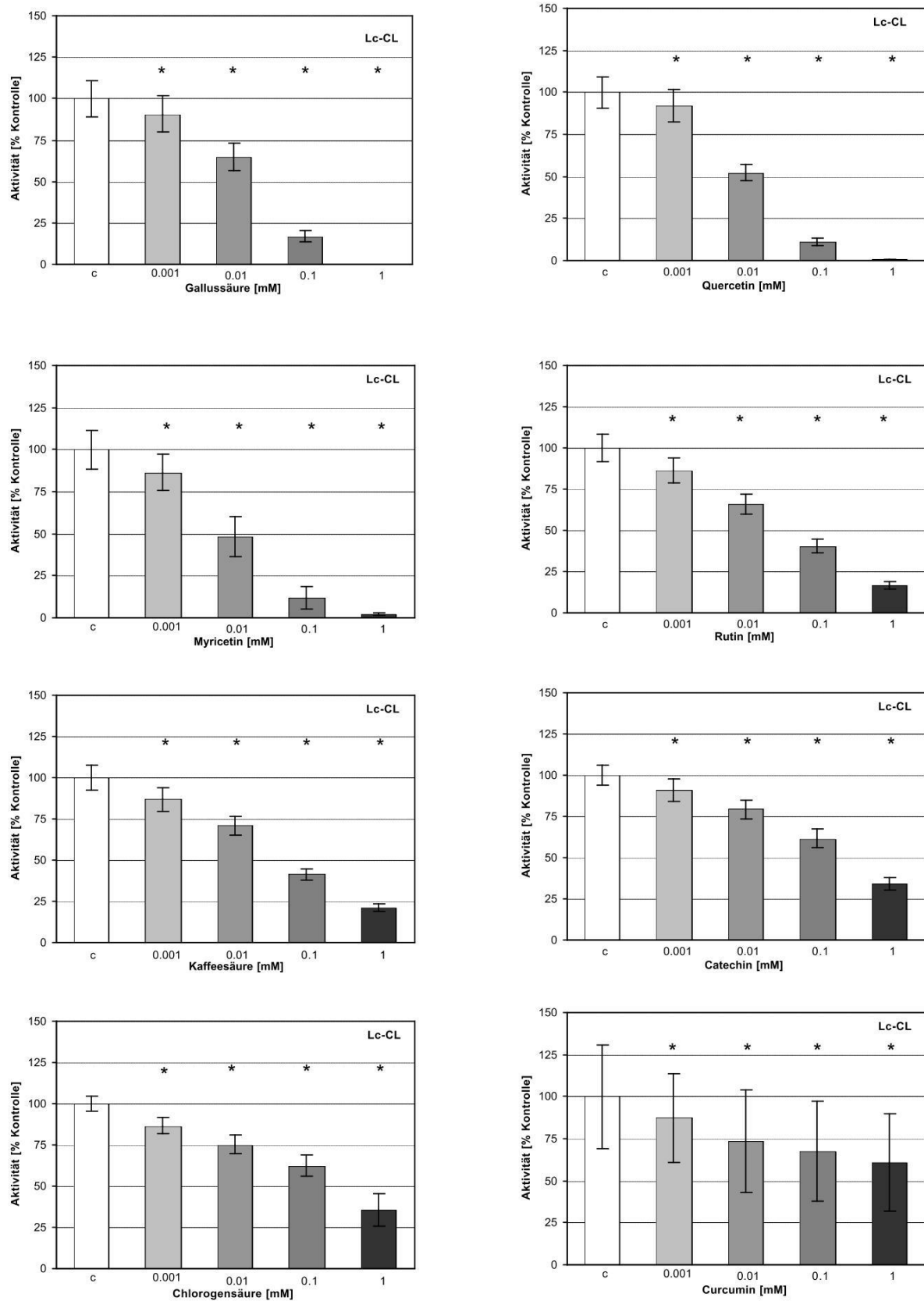


Abb. 8a: Ergebnisse der Substanzen, die die Lc-CL-Messung reduzieren; arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

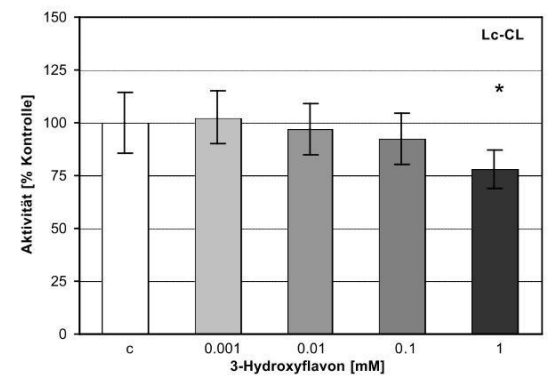
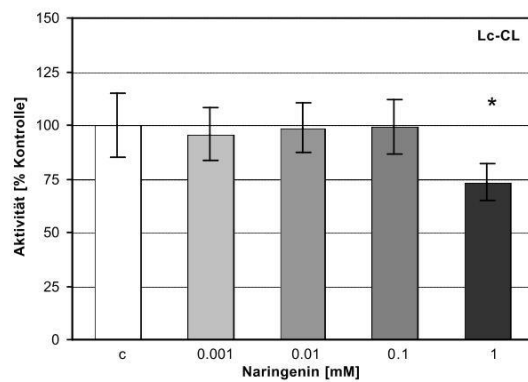
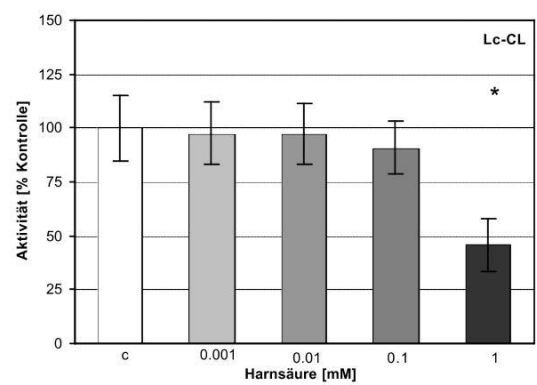
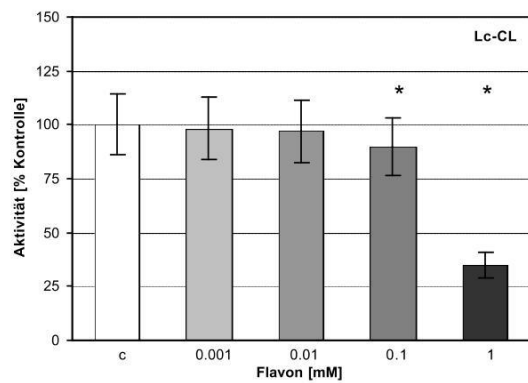
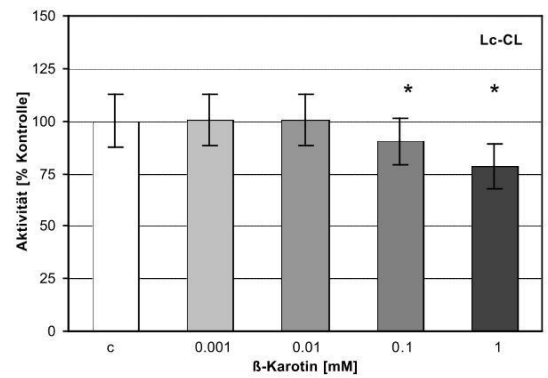
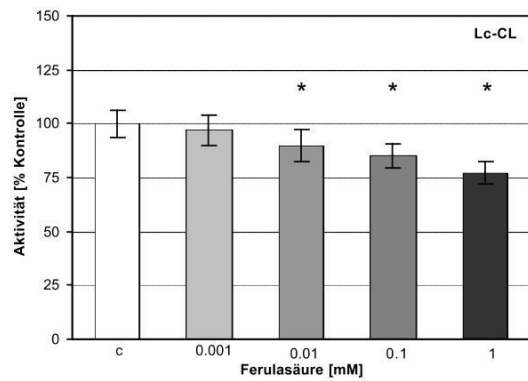
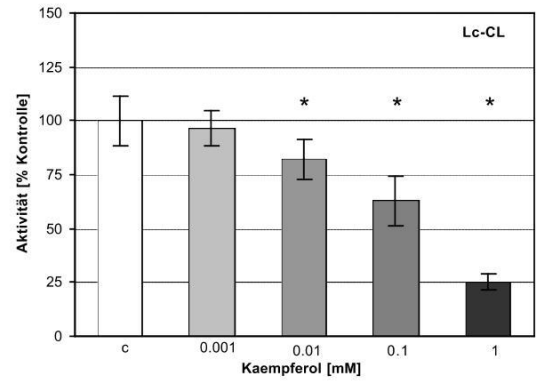
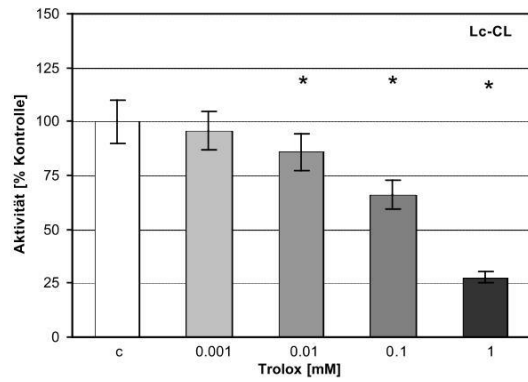


Abb. 8b: Ergebnisse der Substanzen, die die Lc-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

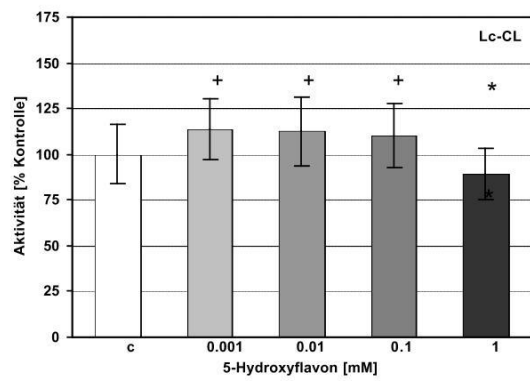
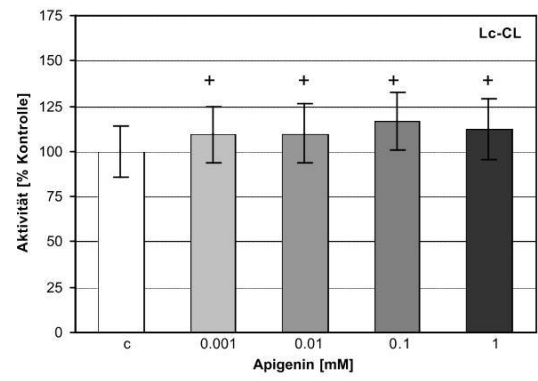
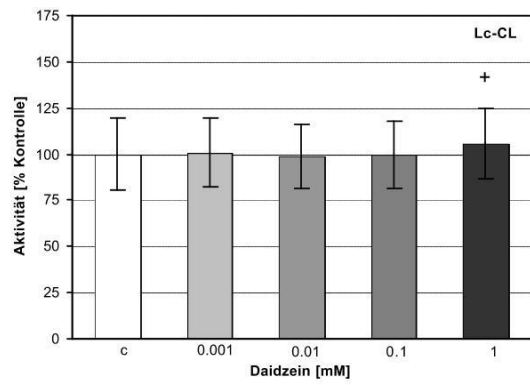


Abb. 8c: Ergebnisse der Substanzen, die die Lc-CL-Messung nicht reduzieren; arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

3.2. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut

In diesem Modellversuch konnte für alle untersuchten Substanzen eine signifikante Reduktion der VB-CL nachgewiesen werden (Abb. 9a bis 9c). Die Unterschiede waren lediglich konzentrationsabhängig. Am deutlichsten wurde die VB-CL von Curcumin, Genistein, Rutin, Apigenin und Daidzein supprimiert. Eine signifikante Verminderung der Radikalbildung trat bei Quercetin, Kaempferol, Naringenin, Gallussäure, Myricetin, Catechin, Kaffeesäure, Ferulasäure und Chlorogensäure bis zur Konzentration von 0,01 mM auf. Geringere Wirkungen zeigten Ascorbinsäure, Trolox, Flavon, 5-Hydroxyflavon, und β -Karotin sowie Chrysin, 3-Hydroxyflavon und Harnsäure. Der Modellversuch mit Harnsäure ergab nur bei einer Konzentration von 1 mM einen Hemmeffekt, der aber prozentual gesehen ausgesprochen stark war.

3.3. Erfassung prooxidativer/antioxidativer Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System

Bis auf eine Ausnahme, die Substanz Chrysin, erfolgte bei allen weiteren 21 Prüfsubstanzen eine signifikante Verminderung der durch die XO vermittelten CL (Abb. 10a bis 10c). Die Unterschiede bei der Supprimierung durch die verschiedenen Substanzen traten allerdings bei unterschiedlichen Konzentrationen auf. Gallussäure, Catechin, Curcumin, Ascorbinsäure, Myricetin, Kaffeesäure, Kaempferol, Quercetin, 3-Hydroxyflavon, Genistein, Harnsäure, Ferulasäure, Trolox, Chlorogensäure und Daidzein reduzierten die XO vermittelte CL sehr stark. Bei Rutin, 5-Hydroxyflavon und β -Karotin war der Effekt moderat. Noch geringere hemmende Effekte zeigten Apigenin, Naringenin und Flavon.

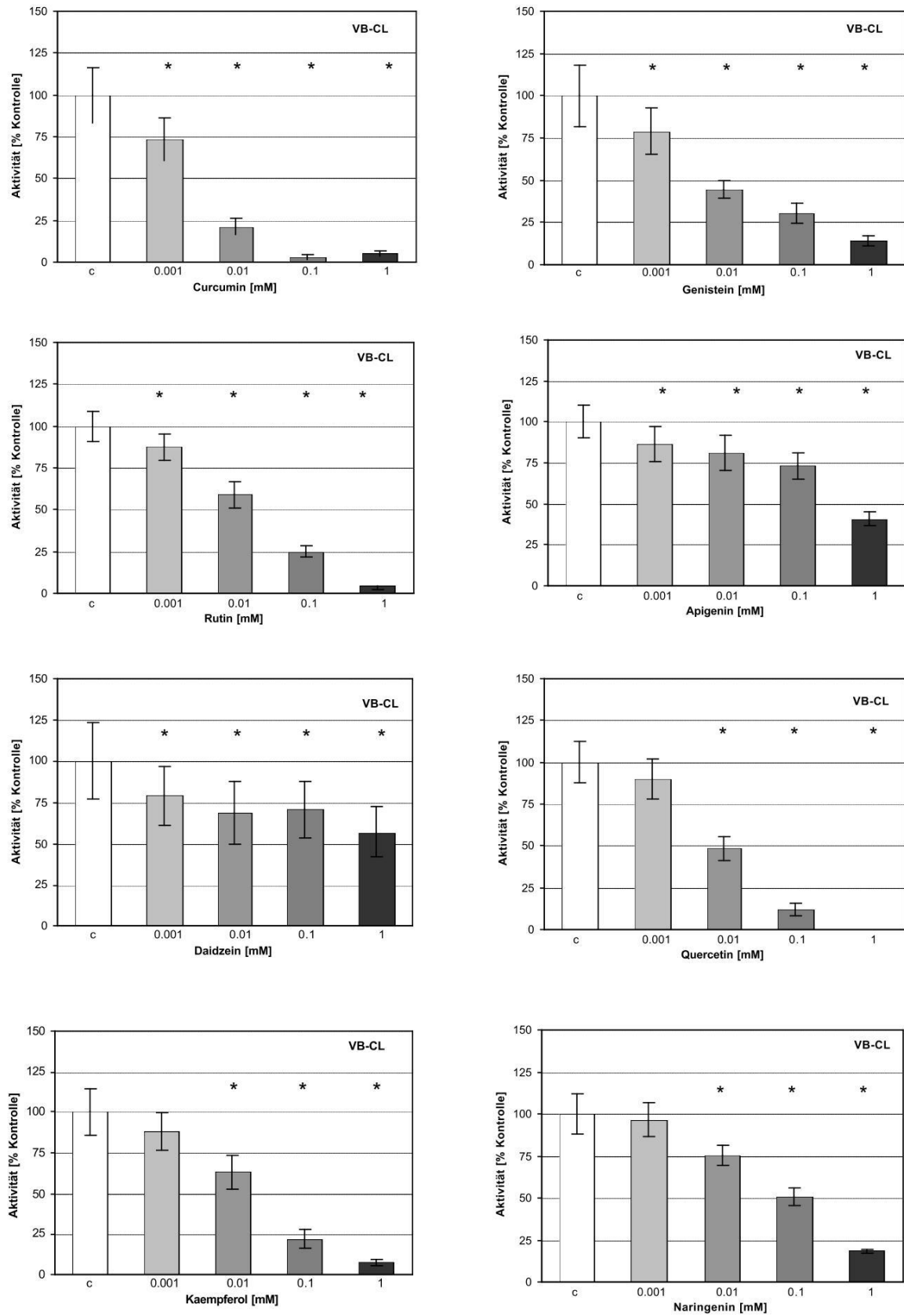


Abb. 9a: Ergebnisse der Substanzen, die die VB-CL-Messung reduzieren
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs Kontrolle (c)

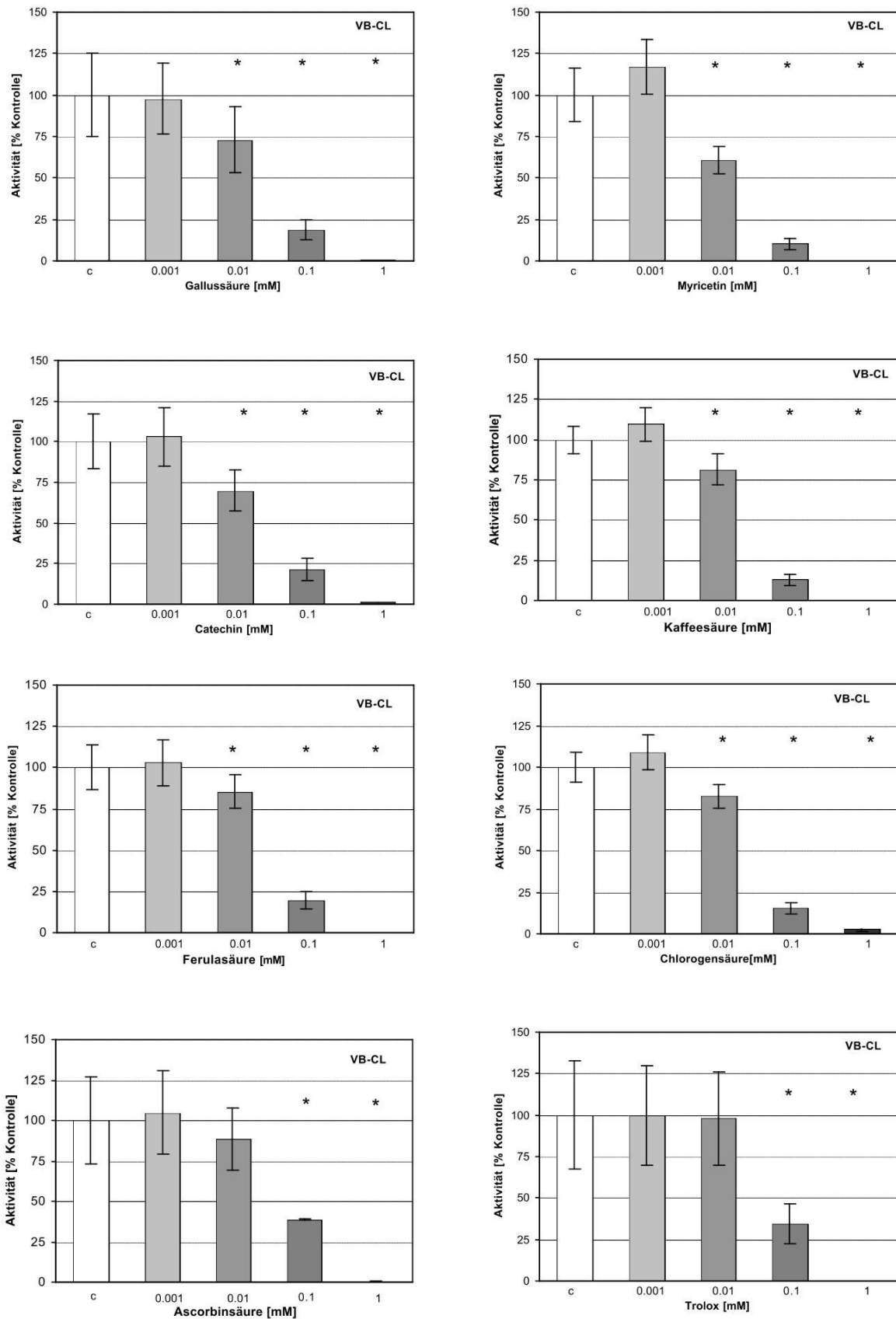


Abb. 9b: Ergebnisse der Substanzen, die die VB-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

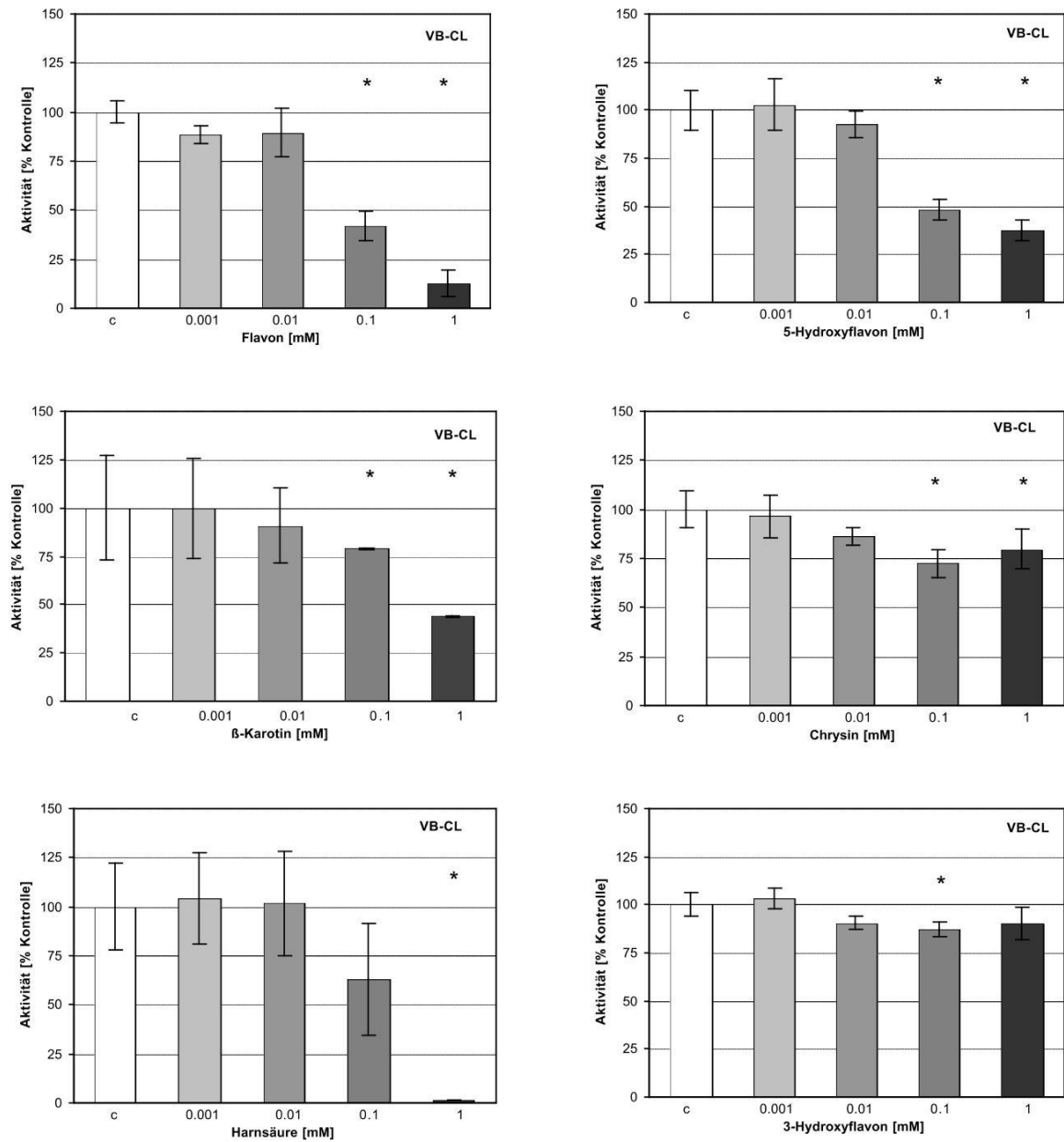


Abb. 9c: Ergebnisse der Substanzen, die die VB-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

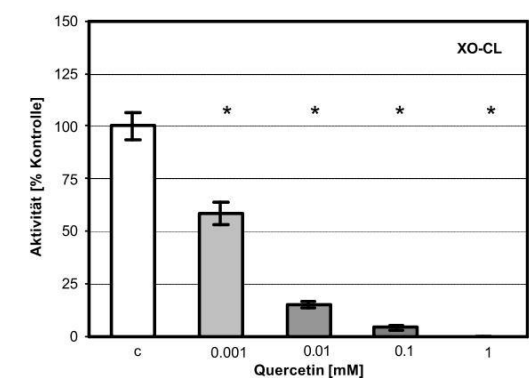
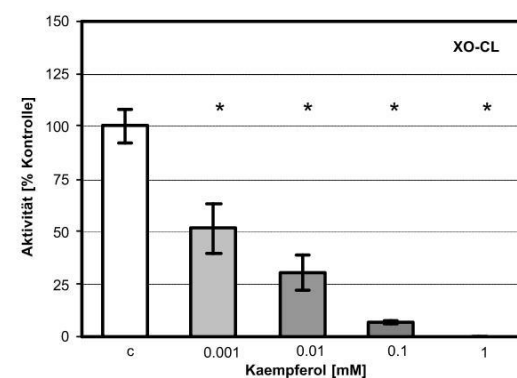
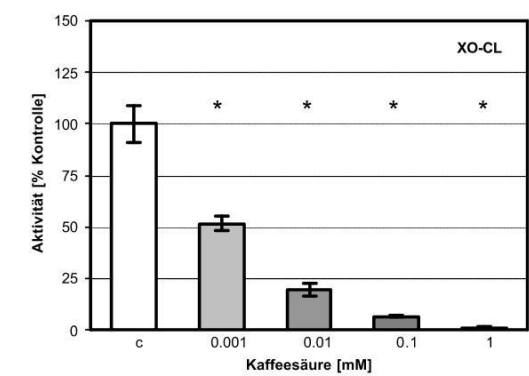
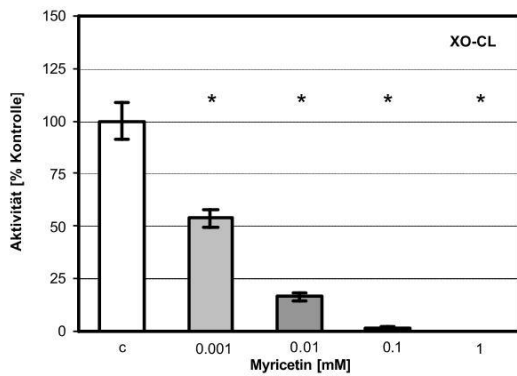
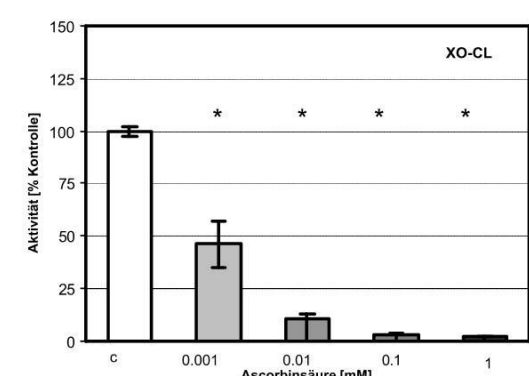
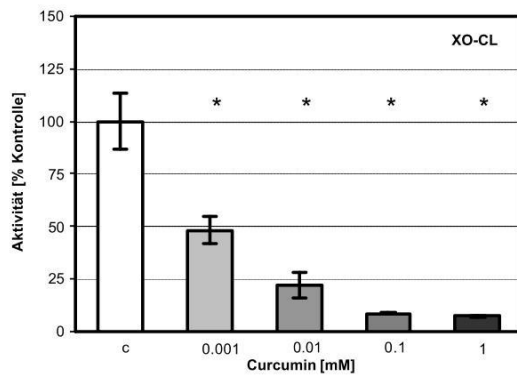
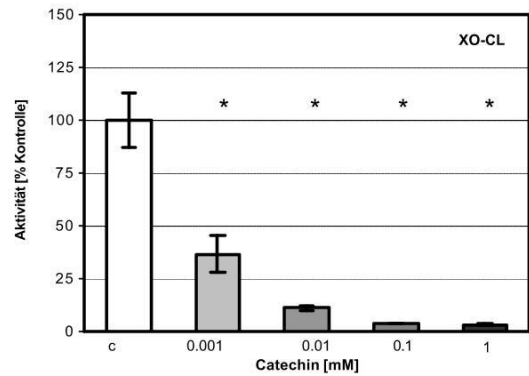
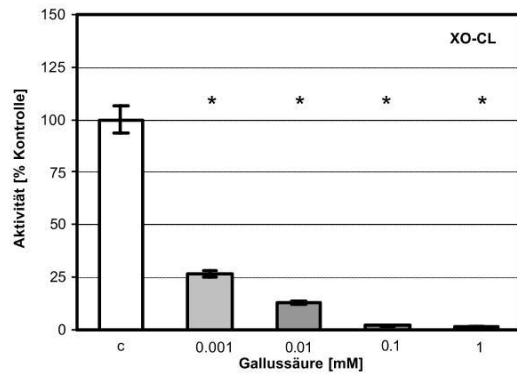


Abb. 10a: Ergebnisse der Substanzen, die die XO-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

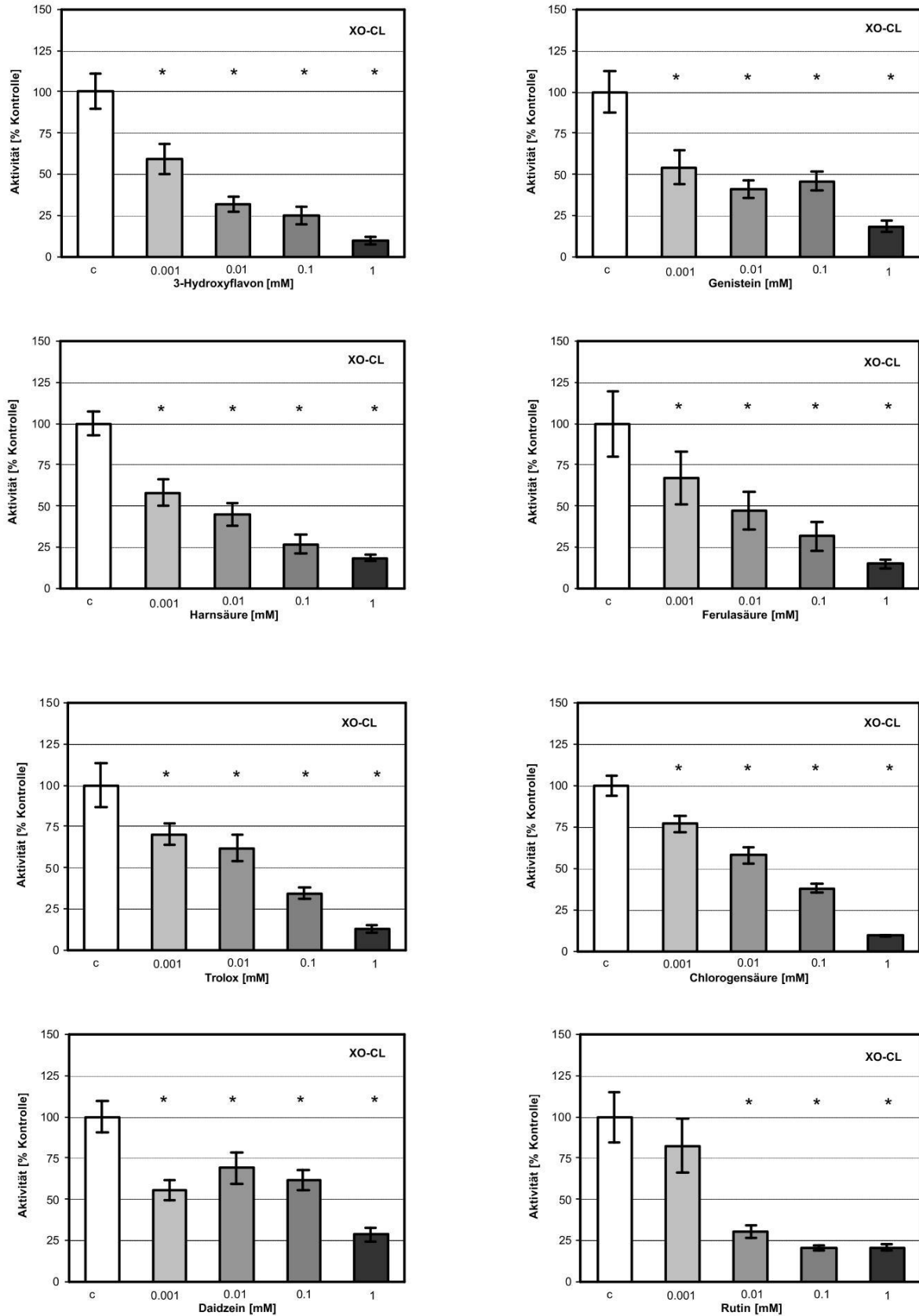


Abb. 10b: Ergebnisse der Substanzen, die die XO-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, n = 6, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

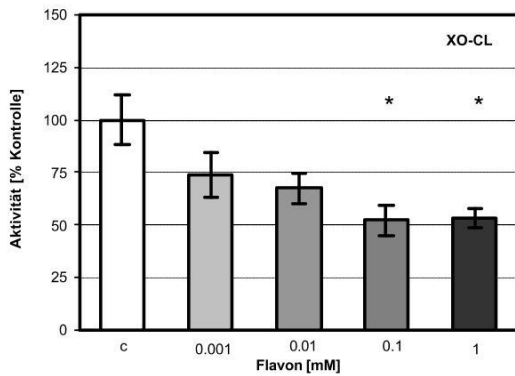
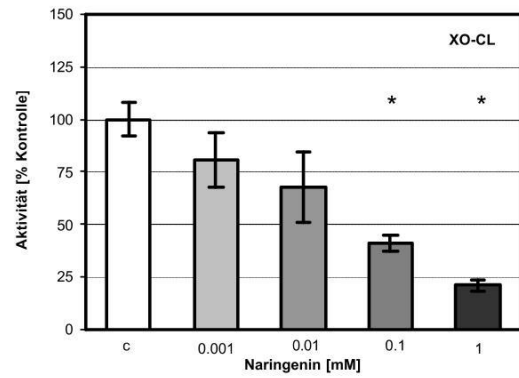
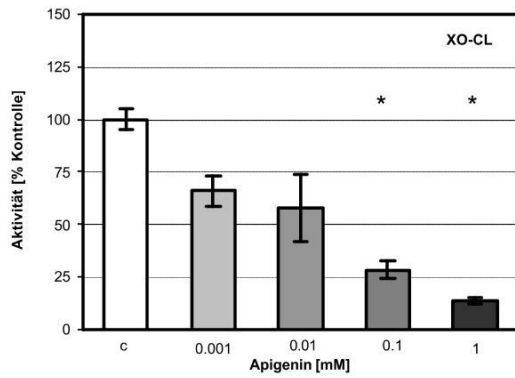
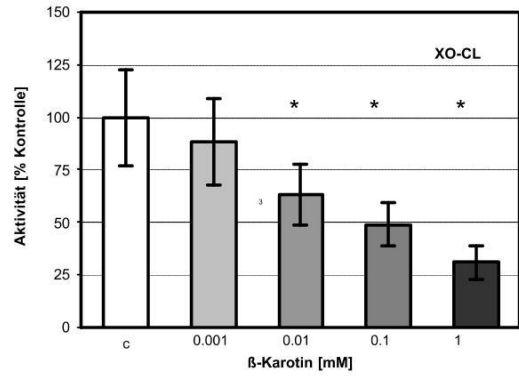
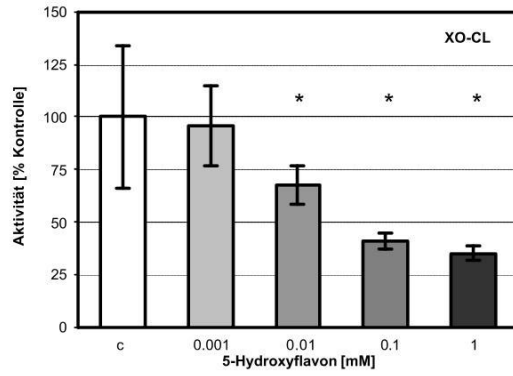


Abb. 10c: Ergebnisse der Substanzen, die die XO-CL-Messung reduzieren;
arithmetische Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (c)

3.4. Spektrales Bindungsverhalten der untersuchten Substanzen an das Cytochrom

P-450

Bei insgesamt 8 der 22 geprüften Substanzen erfolgte keine Bindung. Dies waren Flavon, 3-Hydroxyflavon, 5-Hydroxyflavon, Rutin, Daidzein, Genistein, Gallussäure und Chlorogensäure.

Dem typischen Kurvenverlauf von Hexobarbital folgten Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Curcumin, Kaffeesäure und Ferulasäure. Diese sechs Substanzen konnten demnach dem Bindungstyp I zugeordnet werden (Abb. 11b), ebenso wie β -Karotin (Abb. 11a) als Referenzsubstanz. Bei Chrysin (Abb. 11b) ist eine eindeutige Zuordnung kaum möglich, wobei die Kurvenverläufe am ehesten dem Bindungstyp I entsprechen könnten.

Das für Anilin typische Differenzspektrum wiesen Apigenin, Naringenin und Catechin auf. Diese Substanzen konnten somit dem Bindungstyp II zugeordnet werden (Abb. 11c) sowie die Referenzsubstanz Ascorbinsäure (Abb. 11a). Für Trolox ließe sich diese Aussage nur bedingt machen und der Kurvenverlauf von Harnsäure erlaubt keine eindeutige Zuordnung (Abb. 11a).

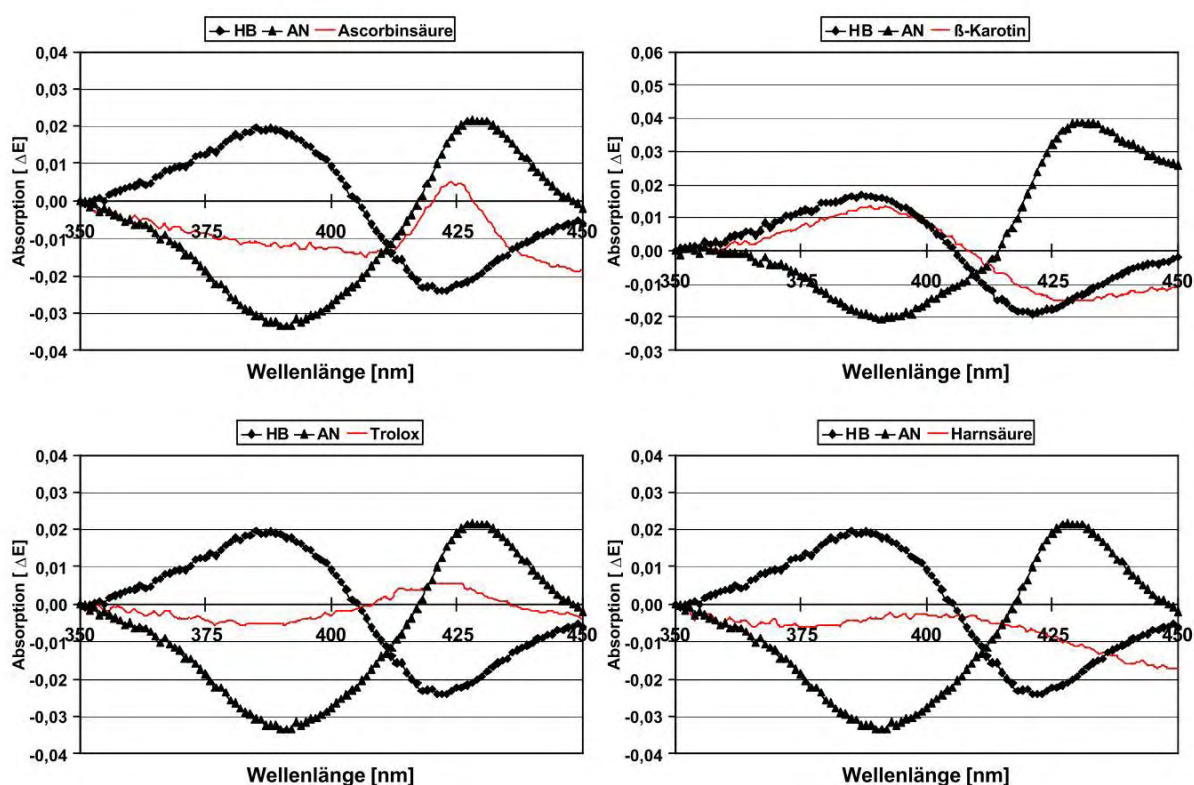


Abb. 11a: Spektrales Bindungsverhalten der Referenzsubstanzen
HB = Hexobarbital; AN = Anilin

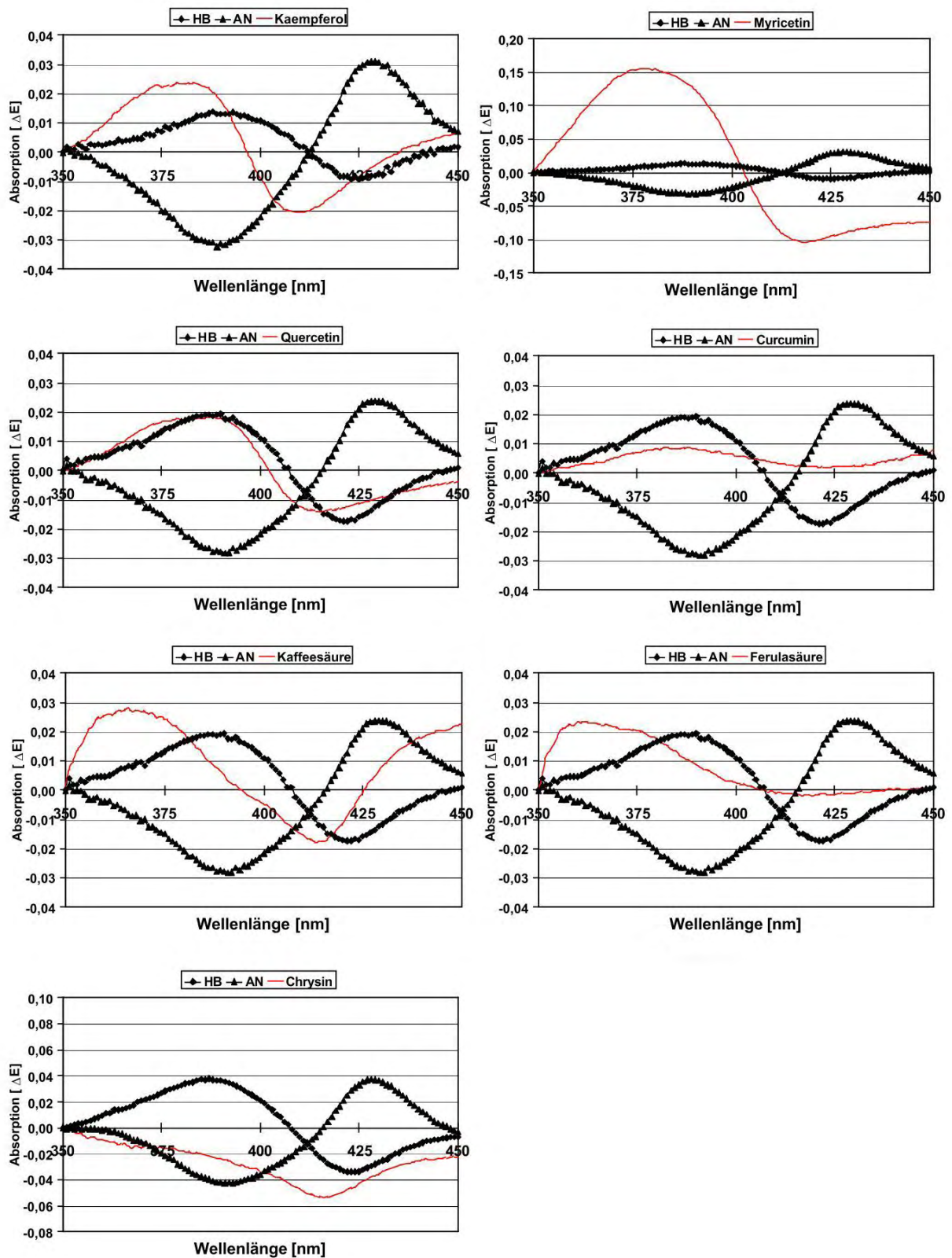


Abb. 11b: Spektrales Bindungsverhalten der Prüfsubstanzen, die am ehesten dem Bindungstyp I entsprechen
HB = Hexobarbital; AN = Anilin

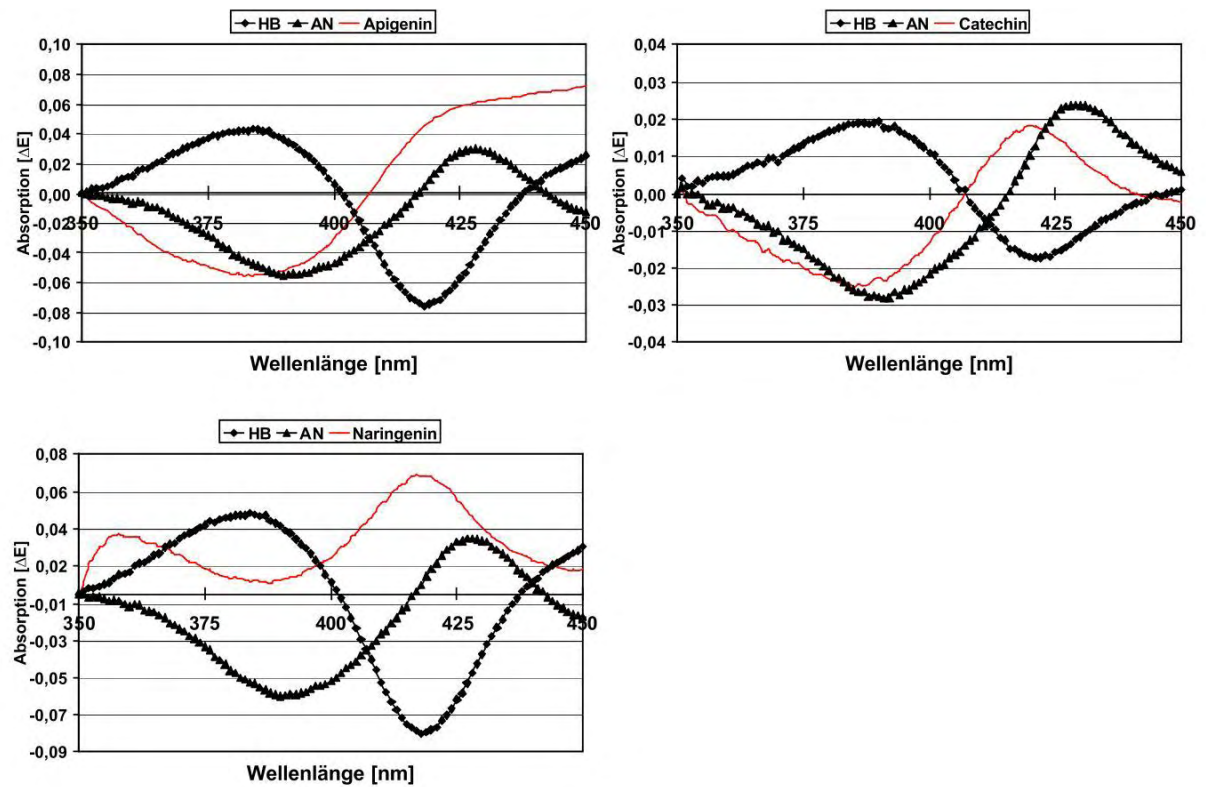


Abb. 11c: Spektrales Bindungsverhalten der Prüfsubstanzen, die am ehesten dem Bindungstyp II entsprechen
HB = Hexobarbital; AN = Anilin

3.5. Ergebnisübersicht

Abschließend sollen die Ergebnisse der Unterpunkte 3.1. bis 3.4. tabellarisch nach der Reaktionstärke qualitativ dargestellt werden (Tab. 4). Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wurden überwiegend hemmende Effekte der Pflanzenphenole auf die Radikalbildung gefunden.

Tabelle 4: Gesamtübersicht der Ergebnisse aller Modellversuche

| Gruppe | Substanz | P450-Bind. (Typ) | Oxidase - Effekte | | | | VB-CL | XO-CL |
|----------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------|-------------------------------|-----|-------|-------|
| | | | Lm-CL | Lc-CL | H ₂ O ₂ | LPO | | |
| Referenz-substanzen | Ascorbinsäure | II | ↓ | (↓) | ↓ | ↑↑ | ↓ | ↓↓↓ |
| | β-Karotin | I | ↓ | ↓ | ↓ | (↑) | ↓ | ↓↓ |
| | Trolox | (II) | ↓↓↓ | ↓↓ | ↓ | ↓↓ | ↓ | ↓↓↓ |
| | Harnsäure | Ø | ↓↓ | (↓) | ↑↑ | ↓ | ↓ | ↓↓↓ |
| Phenol-carbon-säuren | Gallussäure | Ø | ↓↓ | ↓↓↓ | ↑↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| | Kaffeesäure | I | ↓↓ | ↓↓↓ | ↑ | ↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| | Ferulasäure | I | ↓↓ | ↓↓ | Ø | ↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| | Chlorogensäure | Ø | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↑↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| Flavone | Flavon | Ø | (↓) | ↓ | ↓↓ | ↑/↓ | ↓ | ↓ |
| | 5-Hydroxyflavon | Ø | Ø | ↑/↓ | (↓) | ↓ | ↓ | ↓↓ |
| | Chrysin | (I) | ↓↓↓ | Ø | ↓↓↓ | ↓↓ | ↓ | Ø |
| | Apigenin | II | ↓↓ | ↑↑↑ | (↓) | ↓↓ | ↓↓↓ | ↓ |
| | Rutin | Ø | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↑ | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓ |
| Flavonole | 3-Hydroxyflavon | Ø | ↓↓↓ | (↓) | Ø | ↓↓ | ↓ | ↓↓↓ |
| | Kaempferol | I | ↓↓ | ↓↓ | Ø | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| | Quercetin | I | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| | Myricetin | I | ↓ | ↓↓↓ | ↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| Isoflavone | Daidzein | Ø | Ø | (↑) | ↓ | ↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ |
| | Genistein | Ø | ↓ | Ø | ↓↓ | ↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ |
| Flavanone | Naringenin | II | ↓↓ | (↓) | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓ |
| Flavanole | Catechin | II | ↓↓ | ↓↓↓ | ↑↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| Chalcone | Curcumin | I | ↓ | ↓↓↓ | ↑ | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ |

signifikante Reduktion

| | |
|------------------------|-----|
| 1 mM Konzentration | (↓) |
| 0,1 mM Konzentration | ↓ |
| 0,01 mM Konzentration | ↓↓ |
| 0,001 mM Konzentration | ↓↓↓ |

nicht eindeutige Wirkung ↑/↓

Bindungstyp I oder II

signifikante Steigerung

| | |
|------------------------|-----|
| 1 mM Konzentration | (↑) |
| 0,1 mM Konzentration | ↑ |
| 0,01 mM Konzentration | ↑↑ |
| 0,001 mM Konzentration | ↑↑↑ |

kein Effekt Ø

4. Diskussion

Bei der Metabolisierung von Fremdstoffen durch das Cyt P450 können freie Radikale entstehen, die meist nur von kurzer Lebensdauer sind (Superoxidradikalanionen ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikale (HO^{\bullet}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie reaktive Intermediate). ROS können eine Reaktionskette auslösen, die zur Bildung weiterer Radikale und zur Peroxidation von Lipiden, Proteinen und DNS und schließlich zur Zerstörung der Zelle führen kann (KLINGER 1995, OESCH 1994). Auf Grund der toxischen Wirkungen der freien Radikale ist es notwendig zu wissen, durch welche Substanzen ROS inaktiviert werden können. Unter diesem Gesichtspunkt wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Pflanzen-Phenole mit den als Protektoren bekannten Vitaminen A, C und E sowie der Harnsäure verglichen. Es sollten mögliche prooxidative oder antioxidative Eigenschaften der Testsubstanzen herausgefunden werden. Dies erfolgte in vitro mittels unterschiedlicher Modellreaktionen. Die Mehrzahl der geprüften Substanzen zeigte hemmende Eigenschaften auf die Radikalbildung. Doch gab es in einigen Versuchsreihen auch Substanzen, die die Entstehung von ROS förderten. Die Stärke der gefundenen antioxidativen Eigenschaften bei den einzelnen Substanzen war abhängig vom jeweils verwendeten Modellversuch. Die Auswertung der Ergebnisse soll daher in zweierlei Hinsicht erfolgen. Zum einen ergaben sich in Abhängigkeit von der angewandten Methode bei den einzelnen Substanzen z. T. differente Testergebnisse, andererseits zeigten sich bei einigen Substanzen in Rahmen eines Modellversuchs ähnliche Effekte. Daher erweist es sich als sinnvoll, im Zusammenhang mit den verschiedenen Versuchsergebnissen auch die unterschiedlichen Strukturen der Flavonoide zu berücksichtigen, um dadurch entsprechende Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkennen zu können. Die gezielte Auswahl der untersuchten Pflanzen-Phenole, die verschiedenen Untergruppen angehören, ermöglichte eine differenzierte Bewertung der Untersuchungsergebnisse.

Die Untersuchungsergebnisse wurden vor allem an Rattenlebermikrosomen gewonnen. Da es z. T. Übereinstimmungen bei den am Fremdstoffwechsel beteiligten Cyt P450-Arten bei der Ratte und beim Mensch gibt (s. Tabelle 2), sind, mit gewissem Vorbehalt natürlich, die gewonnenen Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus übertragbar.

4.1. Einfluß der Prüfsubstanzen auf die Oxidase-Funktion des Cytochrom P450

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob die zu untersuchenden pflanzlichen Phenole die Oxidasefunktion des Cyt P450 beeinflussen und auf welche Art und Weise dies geschieht. Dabei sollte herausgefunden werden, in wieweit die untersuchten Testsubstanzen als Entkoppler des oxidativen Zyklus wirken und somit zur Bildung freier Radikale beitragen (= prooxidative Eigenschaften) oder ob sie die Bildung freier Radikale während des Cyt P450-Reaktionszyklus reduzieren bzw. entstandene Radikale neutralisieren können (= antioxidative Eigenschaften). Die möglichen antioxidativen Wirkungen der Testsubstanzen können einerseits durch „echte“ Radikalfängereigenschaften der jeweiligen Substanz verursacht sein oder aber andererseits durch eine Wechselwirkung der Substanz mit dem Cyt P450, und somit durch eine Hemmung der Oxidase-Funktion, hervorgerufen werden.

4.1.1. NADPH/Fe²⁺-stimulierte Lipidperoxidation

Neben der Reduktion des Cytochroms P450 kann die Cytochromreduktase auch in Anwesenheit von Eisensalzen und Nukleosidphosphaten Membranphospholipide peroxidieren (ELSTNER 1990). Die Peroxidation führt zur Zerstörung der Membranstrukturen. Dabei kommt es zur Freisetzung von MDA, welches mit Hilfe der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) gemessen werden kann. Eine supprimierte Lipidperoxidation läßt auf Radikalfängereigenschaften der untersuchten Substanz bzw. eine Hemmung der Oxidase-Funktion des Cyt P450 durch die Testsubstanz schließen.

Von den vier Referenzsubstanzen zeigten sowohl Trolox als auch die Harnsäure hemmende Eigenschaften, wobei sich dies insbesondere für Trolox deutlich nachweisen ließ. Das Ergebnis entspricht den Untersuchungen von MITCHELL et al. (1998). β -Karotin und Ascorbinsäure steigerten dagegen sogar die Radikalbildung.

Mit Ausnahme von Flavon hemmten in diesem Modellversuch alle weiteren Pflanzenphenole die Lipidperoxidation. Flavon reduzierte nur in höchster Konzentration (1 mM) die Bildung von ROS. Die Flavonole Curcumin und Rutin hingegen unterdrückten die Radikalbildung auch noch signifikant bei der niedrigsten im Versuch angewandten Konzentration von 0,001 mM. Bei allen weiteren Prüfsubstanzen konnten Hemmungen der LPO bei Konzentrationen von 0,01 mM bzw. 0,1 mM aufgezeigt werden. Kaffeesäure

hemmte die Reaktion zwar nur in relativ hoher Konzentration, allerdings war das Ausmaß der Hemmung gegenüber den anderen Substanzen dieser Gruppe äußerst stark. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch BORS et al. (1996) und MITCHELL et al. (1998) bei den Untersuchungen zur Lipidperoxidation mit Pflanzen-Phenolen. Insgesamt kann man sagen, daß alle Pflanzen-Phenole, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration, in diesem Modellversuch zu einer Hemmung der LPO führten. Die Referenzsubstanzen hingegen zeigten keine so einheitliche Wirkungsweise.

4.1.2. H₂O₂-Bildung

Bei der schrittweisen Oxidation von Sauerstoff entsteht als zweites Zwischenprodukt Wasserstoffperoxid. Es fällt somit auch unter physiologischen Bedingungen als Nebenprodukt im Cyt P450-Zyklus an. Substanzen, die diesen Reaktionszyklus entkoppeln können und damit eine direkte Übertragung von zwei Elektronen auf den molekularen Sauerstoff bewirken, führen zu einer Steigerung der H₂O₂-Bildung. Wasserstoffperoxid selbst kann dadurch die Quelle für das besonders toxische Hydroxylradikal (Fenton-Reaktion) sein. Damit ist die gesteigerte H₂O₂-Bildung, als Folge des entkoppelten Cyt P450-Zyklus, potentiell zellschädigend.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse ergab ein sehr uneinheitliches Bild, sowohl bei den Referenzstoffen als auch innerhalb der untersuchten Pflanzen-Phenole.

Die Vitamine C, A und E konnten bis zu einer Konzentration von 0,1 mM die H₂O₂-Bildung hemmen, wobei für Ascorbinsäure und Trolox das Ausmaß der Hemmung deutlich stärker war. Auch die Untersuchungen von BUETTNER und JURKIEWICZ (1996) zeigten für Ascorbinsäure hemmende Einflüsse auf die H₂O₂-Bildung. Harnsäure hingegen bewirkte eine Steigerung der H₂O₂-Bildung bereits in niedrigster Konzentration. Gleiches gilt für die Gruppe der Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate (mit Ausnahme von Ferulasäure), für Myricetin, Rutin, Catechin und Curcumin.

Ferulasäure, 3-Hydroxyflavon und Kaempferol beeinflussten die H₂O₂-Bildung nicht. Die Isoflavone Genistein und Daidzein sowie die vier Flavone (Flavon, 5-Hydroxyflavon, Chrysin, Apigenin) hemmten deutlich die Wasserstoffperoxid-Bildung, allerdings auch hier in konzentrationsabhängig unterschiedlichem Ausmaß. Von den Flavonolen unterdrückte lediglich Quercetin die Bildung von H₂O₂.

4.1.3. Lucigenin- und Luminol-verstärkte Chemilumineszenz

Mit Hilfe der Substanzen Lucigenin und Luminol wird die Ausbeute an Lichtimpulsen bei der Lumineszenzmessung verstärkt und zum Nachweis von $O_2^{\bullet -}$ in biologischen Systemen genutzt (FAULKNER und FRIDOVICH 1993). Dabei ist das Maß der NADPH/ Fe^{2+} stimulierten Chemilumineszenz von der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit, der Menge an zugegebenem NADPH und der Eisenkonzentration abhängig (KLINGER et al. 1996, ROST et al. 1998-b). Da in der Literatur noch darüber diskutiert wird, welche Radikale durch Lm bzw. Lc nachgewiesen werden (FAULKNER und FRIDOVICH 1993, KLINGER et al. 1996, MÜLLER-PEDDINGHAUS und WURL 1987), sollten die Ergebnisse der Lm-CL und der Lc-CL immer im Zusammenhang mit den Versuchsdaten der anderen Modellmethoden gesehen werden.

Die Messung der Lm-CL ließ, bis auf zwei Ausnahmen (5-Hydroxyflavon und Daidzein), erkennen, daß alle Pflanzen-Phenole die Radikalbildung hemmen. Bei den Referenzstoffen war beim Trolox die Inhibition am stärksten ausgeprägt, gefolgt von der Harnsäure.

Chlorogensäure, Chrysin, 3-Hydroxyflavon, Quercetin und Rutin inhibierten den Reaktionsablauf ebenso stark wie Trolox. Eine Rangfolge der einzelnen Gruppen der Pflanzen-Phenole in Abhängigkeit von ihrer Struktur ließ sich nicht festlegen. Es gab bei den Substanzen stets konzentrationsabhängig unterschiedlich starke Effekte, so daß keine Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgezeigt werden konnten.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Messungen der Lc-CL erzielt. Wobei hier allerdings drei Substanzen, Apigenin, 5-Hydroxyflavon und Daidzein, die Radikalbildung förderten. Apigenin und 5-Hydroxyflavon, beide aus der Gruppe der Flavone, induzierten die Bildung von Radikalen auch noch in der geringsten angewandten Konzentration. Eine Hemmung der Lc-CL konnte für 5-Hydroxyflavon nur bei der höchsten Konzentration von 1 mM gemessen werden.

Die Referenzsubstanzen zeigten ebenfalls hemmende Wirkungen: am stärksten wieder beim Trolox ausgeprägt, gefolgt vom β -Karotin.

Genistein und Chrysin hatten keinen Einfluß auf die Lc-CL. Alle Flavonole und Phenolcarbonsäuren sowie Rutin, Catechin und Curcumin unterbanden signifikant die Radikalbildung, teilweise bereits bei höchster Verdünnung. Auch Flavon und Naringenin wirkten in diesem Versuch antioxidativ, wenn auch nur in höheren Konzentrationen (0,1 mM bzw. 1 mM).

4.2. Einfluß der Prüfsubstanzen auf die Luminol- verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut

Zum Nachweis möglicher Scavenger-Eigenschaften der untersuchten Substanzen wurde als eine weitere Modellreaktion die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut durchgeführt. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Untersuchungen wird hier die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies nicht durch das Cyt P450 vermittelt, sondern eine NADPH-Oxidase ist als radikalproduzierendes Enzym an der Reaktion beteiligt.

Deshalb könnten „echte“ Radikalfängereigenschaften bei den Substanzen als wahrscheinlicher Wirkungsmechanismus vermutet werden, bei denen sich sowohl bei der Messung der VB-CL als auch bei der Bestimmung der LPO, der H₂O₂-Bildung, der Lm-CL und der Lc-CL signifikante Hemmeffekte ergeben.

Durchweg für alle geprüften Substanzen konnten hemmende Einflüsse auf die VB-CL nachgewiesen werden. Unterschiede waren lediglich in den effektiv wirksamen Konzentrationen zu sehen.

Die beiden Isoflavone sowie Apigenin, Rutin und Curcumin inhibierten die Reaktion bereits in niedrigster Konzentration. Chrysin und 3-Hydroxyflavon hemmten die VB-CL zwar auch in höchster Verdünnung, absolut gesehen war diese Hemmung aber nur gering. Ascorbinsäure verminderte die VB-CL nur in höheren Konzentrationen (0,1 mM und 1 mM), allerdings war der Hemmeffekt prozentual relativ stark ausgeprägt.

Von den Referenzstoffen hemmten die Vitamine in einer Konzentration ab 0,1 mM. Bei Harnsäure war dagegen eine Konzentration von 1 mM notwendig.

In diesem Modellversuch zeigte sich ganz deutlich, daß die überwiegende Anzahl der geprüften Pflanzenphenole, im Vergleich zu den Vitaminen, einen stärkeren hemmenden Einfluß auf die Radikalbildung hatte. In den von LIMASSET et al. (1999) vorgenommenen Chemilumineszenz-Messungen an menschlichen Leukozyten konnten ebenfalls für alle 18 untersuchten Pflanzen-Phenole deutliche Hemmungen der Reaktionsabläufe gezeigt werden.

4.3. Einfluß der Prüfsubstanzen auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System

Auch bei dieser Modellreaktion steht die Bildung der Radikale ebenfalls nicht im Zusammenhang mit dem Cyt P450-Reaktionszyklus. Damit ergibt sich eine zusätzliche Möglichkeit zur Beurteilung der prooxidativen / antioxidativen Eigenschaften der geprüften Pflanzen-Phenole. Es können mit hoher Wahrscheinlichkeit „echte“ Radikalfängereigenschaften bei den Substanzen angenommen werden, bei denen sich sowohl bei den Messungen der CL im XO-System und der VB-CL als auch bei der LPO, der H₂O₂-Bildung, der Lm-CL und der Lc-CL signifikante Hemmeffekte ergeben.

Prinzipiell bestätigten die Ergebnisse der CL-Messung im XO-System die der VB-CL-Untersuchungen. Eine Ausnahme bildete in diesem Versuchsansatz lediglich Chrysin, das keinen Einfluß auf die Radikalbildung ausübte. Alle anderen Prüfsubstanzen hemmten deutlich, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration, die Bildung der Reaktionsprodukte. Ebenfalls deutliche Hemmungen auch in niedrigen Konzentrationen ergaben die Untersuchungen zur XO-Hemmung durch Flavonoide von CIMANGA et al. (2001) und NAGAO et al. (1999). Allerdings erfolgten bei letzterem die Messungen mittels HPLC und auch Chrysin hemmte die Reaktion.

Für die Referenzstoffe konnten in diesem Versuch, der CL-Messung im XO-System, überwiegend stark hemmende Eigenschaften gefunden werden.

Sieht man die hier gewonnenen Untersuchungsergebnisse im Zusammenhang mit denen der anderen Versuche, so kann man schlußfolgern, daß alle Prüfsubstanzen antioxidative Eigenschaften besitzen. Diese sind allerdings, in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration, unterschiedlich stark ausgeprägt. Es gibt demnach keine Substanz, die ausschließlich radikalbildend wirkte. Bei mindestens vier der insgesamt sechs verschiedenen Modellversuche, die pro Substanz durchgeführt wurden, konnte für alle Substanzen eine signifikante Hemmung der Bildung von ROS gemessen werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Aktionen der DGE zum Gesundheitsschutz, die nachhaltig den regelmäßigen Verzehr von Obst und Gemüse empfiehlt (DGE special 5/2000 und 3/2001).

4.4. Spektrales Bindungsverhalten der Prüfsubstanzen

Mit Hilfe dieser Untersuchung sollte herausgefunden werden, ob die jeweilige Testsubstanz am Cyt P450 bindet. Bei einer Bindung an das Cyt P450 könnte davon ausgegangen werden, daß die Substanz direkten Einfluß auf die Biotransformation anderer Stoffe nehmen kann. Weiterhin würde eine Interaktion mit dem Cyt P450 einen Hinweis darauf geben, daß die untersuchte Substanz auch mit der Oxidase-Funktion des Cyt P450 interagieren könnte, was eine geringere Produktion von Radikalen zur Folge hätte. Eine Substanz, die alle untersuchten Reaktionen hemmt, kann theoretisch sowohl echte Scavenger-Eigenschaften haben als auch die Oxidase-Funktion hemmen.

Von den vier Referenzsubstanzen bindet nur Ascorbinsäure an das Cyt P450. Für Harnsäure, Trolox und β -Karotin kann keine so eindeutige Aussage zum Bindungsverhalten gemacht werden.

Auch von den 18 Pflanzenphenolen, konnte nur für die Hälfte der Substanzen eine Bindung eindeutig nachgewiesen werden. Zu keiner Bindung an das Cyt P450 kam es bei Gallussäure, Chlorogensäure, Flavon, 5-Hydroxyflavon, Chrysin, 3-Hydroxyflavon, Rutin, Daidzein und Genistein. Für diese Pflanzenphenole und Referenzstoffe erscheinen Scavenger-Eigenschaften im eigentlichen Sinne wahrscheinlicher. Da in unseren Untersuchungen keine Interaktion mit dem Cyt P450 erfolgte und demzufolge auch kein Einfluß auf die Biotransformation anderer Substanzen zu erwarten ist, wären diese Prüfsubstanzen für einen prophylaktischen oder auch therapeutischen Einsatz besonders geeignet. Auch die Ergebnisse anderer Untersuchungen, insbesondere mit den Isoflavonen Daidzein und Genistein zeigten, daß durch diese beiden Substanzen keine Bindung an das Cyt P450 erfolgte (KISHIDA et al. 2000, SHERTZER et al. 1999). Selbst bei Verabreichung von Flavonoiden (Chrysin und Genistein) in hoher Dosierung waren die Wirkungen auf den Metabolismus anderer Substanzen nur gering (BREINHOLT et al. 1999).

4.5. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Abschließend sollen die verschiedenen Stoffgruppen untereinander verglichen werden, um darzustellen, inwieweit deren unterschiedliche chemische Struktur einen Einfluß auf die Testergebnisse und damit auch auf Radikalfänger- / Scavengereigenschaften der Prüfsubstanzen ausübt.

Bei den Phenolcarbonsäuren ergibt sich ein recht einheitliches Bild. Insbesondere bei den Modellversuchen zur CL und der LPO konnten durchweg Inhibitionen gemessen werden. Bei allen Modellversuchen mit CL-Messungen waren signifikante Hemmungen bei Konzentrationen von 0,01 mM, teilweise bereits ab 0,001 mM meßbar. Am stärksten waren die hemmenden Eigenschaften bei der XO vermittelten CL und der Lc-CL nachweisbar. Nicht ganz so starke, aber dennoch signifikante Hemmwirkungen konnten bei der Bestimmung der LPO gemessen werden. Hier wurden signifikante Hemmungen bei der Bildung des Reaktionsproduktes durchweg bei Substanzkonzentrationen von 0,1 mM und 0,01 mM beobachtet. Im Versuch zur H₂O₂-Bildung zeigte die Ferulasäure keinerlei Einfluß. Die anderen drei Phenolcarbonsäuren induzierten die Bildung von Wasserstoffperoxid bis zu einer Verdünnung von 0,01 mM (Gallussäure und Chlorogensäure) bzw. 0,1 mM (Kaffeesäure). Von den vier untersuchten Phenolcarbonsäuren ist eindeutig die Chlorogensäure die Substanz mit den stärksten antioxidativen Eigenschaften, gefolgt von der Gallussäure. Für Kaffee- und Ferulasäure, beides Derivate der Zimtsäure, konnten ebenfalls antioxidative Eigenschaften nachgewiesen werden, deren Stärke aber etwas niedriger war.

Ein nicht ganz so homogenes Bild ergeben die Untersuchungsergebnisse der Flavone, wenngleich auch hier die hemmenden Eigenschaften überwiegen. Im Gegensatz zu den Phenolcarbonsäuren konnten mit vier dieser Substanzen (Ausnahme Rutin) bei der H₂O₂-Bildung signifikante Hemmungen erzielt werden; am stärksten bei Chrysin (0,001 mM), etwas weniger bei Flavon (0,01 mM) und nur noch bei Konzentrationen von 1 mM bei 5-Hydroxyflavon und Apigenin. Die Ergebnisse VB-CL ergaben für alle fünf Flavone hemmende Einflüsse. Besonders starke Inhibitionen konnten für Apigenin und Rutin gemessen werden, die bereits eine signifikante Hemmung bei einer Konzentration von 0,001 mM zeigten. Auch die Modellversuche Lm-CL, XO-CL und die LPO ergaben überwiegend Ergebnisse, die für eine Inhibition durch die Flavone sprachen. Allerdings war stets mindestens eine Substanz dieser Gruppe in jedem Versuch dabei, die entweder keinerlei Einfluß auf die Bildung der Reaktionsprodukte nahm oder diese sogar förderte. Bei der Lm-CL Messung traf dies für 5-Hydroxyflavon zu, bei der Lc-CL Messung ebenfalls für 5-Hydroxyflavon und für Chrysin, bei der Bestimmung der LPO für Flavon und bei der XO-CL Messung wieder für Chrysin. Eine signifikante Steigerung der Radikalbildung bereits bei niedrigster Konzentration ergaben die Lc-CL-Messungen für Apigenin. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den zum Teil stark hemmenden Einflüssen von Apigenin bei allen anderen Modellversuchen. Rutin, Apigenin und Chrysin

wiesen gegenüber Flavon und 5-Hydroxyflavon im allgemeinen deutlich stärkere antioxidative Eigenschaften auf. Diese Ergebnisse kann man auf die zunehmende Zahl von Hydroxylgruppen am Grundgerüst zurück führen. Damit würde bestätigt, daß die Anzahl von Hydroxylgruppen positiv korreliert mit möglichen Radikalfängereigenschaften der untersuchten Substanzen. Dies gilt sowohl für die Bindungsstellen am A-Ring (besonders an den Positionen 5 und 7), als auch am B-Ring. Auch Untersuchungen von BORS et al. (1996), BORS und MICHEL (1999) sowie NIELSEN et al. (1998) bestätigen diese positive Korrelation.

Rutin, als einzige der untersuchten Substanzen mit einem Zuckerrest an der Position C3, hemmte in vier Modellversuchen (Lm-CL, Lc-CL, VB-CL, LPO) signifikant die Bildung der Reaktionsprodukte bereits bei niedrigster Konzentration. Bei der XO-CL konnte für Rutin eine Hemmung schon bei einer Konzentration von 0,01 mM gemessen werden. Lediglich im Versuch zur H₂O₂-Bildung förderte Rutin die Bildung von Wasserstoffperoxid bei Verdünnungen von $\geq 0,1$ mM. Diese positiven antioxidativen Eigenschaften von Rutin stimmen überein mit den Untersuchungen von BEAR und TEEL (2000).

Noch stärker kommt die Korrelation zwischen Anzahl der Hydroxylgruppen und Scavengereffekten bei den Flavonolen zum Ausdruck. Ihr Reaktionsverhalten war ähnlich dem der Phenolcarbonsäuren. Alle Versuche zur CL-Messung und die Bestimmung der LPO zeigten signifikante Hemmungen. Nur Quercetin hemmte die H₂O₂-Bildung und war damit die einzige Substanz in dieser Gruppe, bei der in allen sechs Versuchen inhibierende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Für Quercetin, Myricetin und Kaempferol konnte auch eine Bindung an das Cyt P450 vom Typ I gezeigt werden. Im Vergleich zu den Flavonen zeigte sich deutlich, daß die Hydroxylgruppe in der Position C3 entscheidend für die Ausprägung der antioxidativen Eigenschaften ist. Die Bedeutung der Hydroxylgruppe an dieser Position bestätigen auch die Ergebnisse von anderen Untersuchern (BURDA und OLESZEK 2001, CIMANGA et al. 2001, HEIJNEN et al. 2001, HEILMANN et al. 2000, NOROOZI et al. 1998, PIETTA 2000). Gleichzeitig werden durch mehrere Hydroxylgruppen am B-Ring diese Eigenschaften noch verstärkt, insbesondere an den Positionen A7 und A5. Vergleicht man die Untersuchungsergebnisse von Quercetin und Rutin, so ergeben sich nur geringfügige Unterschiede. Strukturell unterscheiden sich diese beiden Substanzen nur dadurch, daß beim Rutin an der Position C3, anstelle der Hydroxylgruppe, ein Zuckerrest gebunden ist.

Die beiden Isoflavone Daidzein und Genistein hemmten in den Modellversuchen zur VB-CL und XO-CL stark die Radikalbildung (ab 0,001 mM). Die Messung der LPO und der H₂O₂-Bildung ergaben zwar auch bei diesen beiden Substanzen signifikante Hemmungen, aber nur bei Konzentrationen von 0,01 mM bzw. 0,1 mM. Eine Bindung an das Cyt P450 gingen diese beiden Prüfsubstanzen nicht ein. Die Lc-CL wurde durch Genistein nicht beeinflusst; dagegen führte Daidzein zu einer Zunahme der Lc-CL. Es hatte aber andererseits keinen Einfluß auf die Lm-CL. Insgesamt entsprechen die antioxidativen Eigenschaften der Isoflavone in etwa denen der Flavone. Die Bindung des B-Ringes an der Position C2, wie bei den Flavonen, oder an der Position C3 bei den Isoflavonen hat offensichtlich keine wesentlichen Änderungen im antioxidativen Verhalten zur Folge. Damit wären die ähnlichen Reaktionsmuster erklärbar.

Naringenin, als Vertreter der Flavanone, zeigte zwar ebenso wie das Flavonol Quercetin, hemmende Einflüsse auf alle Modellversuche, wobei aber die Hemmungen meistens erst bei einer höheren Konzentrationsstufe auftraten als beim Quercetin. Naringenin besitzt zwar 3 Hydroxylgruppen an den Positionen 4', 5 und 7, kann aber in seinen antioxidativen Eigenschaften eher mit den Flavonen verglichen werden (BEAR und TEEL 2000).

Aus der Gruppe der Flavanole und der Chalcone wurde jeweils nur eine Substanz untersucht. Mit Ausnahme der H₂O₂-Bildung wurden bei allen anderen Versuchen für beide Substanzen signifikante Hemmungen der Radikalbildung gefunden. Curcumin inhibierte die Reaktionen Lc-CL, VB-CL, XO-CL und LPO selbst bei niedrigsten Verdünnungsstufen (0,001 mM). Beim Catechin fanden wir ähnliche Ergebnisse. Catechin und Curcumin entsprechen in ihrer antioxidativen Wirksamkeit den Flavanolen. Auch besitzen beide Substanzen eine Hydroxylgruppe an der Position C3. Diese Hydroxylgruppe am C3-Atom nimmt eine Schlüsselposition für die Stärke der antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide ein.

Von den untersuchten Pflanzen-Phenolen besitzen die Flavonole, insbesondere Quercetin, und die Phenolcarbonsäuren sowie Rutin, Catechin und Curcumin die stärksten antioxidativen Eigenschaften. Auch bei den Untersuchungen von MAKRISS und ROSSITER (2001), PULIDO et al. (2000) und SUGIHARA et al. (1999) erwies sich Quercetin als stärkstes antioxidativ wirkendes Flavonol in allen Versuchen.

Flavone, Isoflavone und das Flavanon Naringenin waren auch deutlich antioxidativ wirksam, allerdings verglichen mit den anderen Substanzen weniger stark. In den Veröffentlichungen von PULIDO et al. (2000), PIETTA (2000), SAWA et al. (1999) und

SILVA et al. (2000) wird ebenfalls den Phenolen eine stärkere antioxidative Wirksamkeit gegenüber den Vitaminen A, C und E bescheinigt.

Sieht man sich die Ergebnisse der als Referenzsubstanzen verwendeten Vitamine sowie der Harnsäure in der vorliegenden Arbeit an, ergibt sich, daß die Chemilumineszenz durch alle vier Substanzen, wenn auch in unterschiedlicher Stärke gehemmt wird. Insgesamt läßt sich sagen, daß die Scavengerfunktion der Referenzsubstanzen geringer ausgeprägt ist als die der Pflanzen-Phenole, d. h. die zur Hemmung notwendigen Konzentrationen liegen durchweg höher. β -Karotin und Vitamin C steigerten sogar die Lipidperoxidation. Allerdings ergaben alle weiteren Modellversuche für Ascorbinsäure hemmende Effekte bezüglich der Radikalbildung. Die Meßwerte für Trolox ergaben in den sechs Modellversuchen immer eine Verminderung der Radikalbildung. Damit waren die Ergebnisse deutlich besser in Bezug auf die antioxidative Wirksamkeit als bei Ascorbinsäure, β -Karotin und Harnsäure. Auch die Untersuchungen von BÖHM und BITSCH (1999) machten die höhere antioxidative Aktivität von Früchten und daraus hergestellten Erzeugnissen gegenüber den Vitaminen A und E deutlich.

Dem Zusammenhang zwischen Krankheit und Ernährung wird seit vielen Jahren immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Dies trifft besonders für Zivilisationskrankheiten wie beispielsweise Adipositas, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs zu. Man weiß, daß Nahrungsmittel aufgrund ihres Gehaltes an spezifischen Stoffen die Gesundheit und das Wohlbefinden der Menschen positiv beeinflussen. Die Kenntnisse darüber, in welcher Art diese Wirkstoffe helfen können, Krankheiten zu lindern oder gar zu verhindern, nehmen ständig zu. Mit der vorliegenden Arbeit sollte dazu ein weiterer Beitrag geleistet werden. Sekundäre Pflanzenstoffe haben nachweislich neben Vitaminen, Mineralien und Ballaststoffen eine gesundheitsfördernde Wirkung.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit konnten eindeutig zeigen, daß insbesondere die Pflanzen-Phenole gute antioxidative Eigenschaften besitzen. Vergleiche der einzelnen Untergruppen der Flavonoide zeigten deutlich, daß eine Hydroxylgruppe an der Position C3 entscheidend für die Ausprägung der antioxidativen Eigenschaften ist. Diese Hydroxylgruppe am C3-Atom nimmt eine Schlüsselposition für die Stärke der antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide ein. Außerdem korreliert die Anzahl von Hydroxylgruppen positiv mit den Radikalfängereigenschaften der untersuchten Substanzen. Dies gilt sowohl für die Bindungsstellen am A-Ring (besonders an den Positionen 5 und 7), als auch am B-Ring.

Spezielle Empfehlungen über Zufuhrmengen zu einzelnen untersuchten Substanzen lassen sich allerdings nicht machen. Die isolierte Aufnahme von „sekundären“ Pflanzenstoffen als Nahrungsergänzungsmittel (z. B. in Form von Tabletten) ist nicht empfehlenswert, da die protektiven Wirkstoffe der Frucht- und Gemüsesorten ihre Wirksamkeit im natürlichen Verbund aller Inhaltsstoffe synergistisch entfalten (RENKAWITZ 1999). Es ist vielmehr wichtig, die gesamte Ernährungsweise auf viel frisches Obst und Gemüse umzustellen. Fünfmal am Tag eine Portion Obst oder Gemüse, verbunden mit einer gezielten Nahrungsmittelauswahl, schafft gute Voraussetzungen, Krankheitsrisiken zu vermindern und die Lebensqualität auch im Alter zu verbessern. Ein Zuviel scheint es hier nicht zu geben, zumal der gesundheitsfördernde Effekt nicht in der einzelnen Substanz liegt, sondern im Zusammenspiel vieler Komponenten seine optimale Wirkung erreicht.

5. Zusammenfassung

Es ist bekannt, daß einige Nahrungsmittel auf Grund ihres Gehaltes an spezifischen Wirkstoffen fördernde Effekte auf das physische und psychische Wohlbefinden ausüben können. Zu den wichtigsten potentiell nützlichen Wirkstoffen zählen die „sekundären Pflanzenstoffe“. Unter diesem Begriff werden über 100.000 Substanzen zusammengefaßt, einige Tausend davon sind Bestandteil unserer Nahrung. Der größte Teil davon sind phenolische Verbindungen. Die antioxidative Aktivität vieler Pflanzen-Phenole ist oft höher als die der bekannten antioxidativ wirkenden Vitamine E und C.

Ausgehend von den bereits nachgewiesenen Radikalfängereigenschaften der Vitamine A, C und E sowie der Harnsäure sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob 18 Pflanzen-Phenole in Abhängigkeit von der eingesetzten Methode unterschiedliche antioxidative/prooxidative Eigenschaften aufweisen.

Den Hauptanteil der vorliegenden Arbeit nahmen Versuche zur Cyt P450 vermittelten Oxidase-Funktion mit Rattenlebermikrosomen ein:

- die stimulierte Lipidperoxidation,
- die Wasserstoffperoxidbildung,
- die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz und
- die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz.

Des weiteren wurde der Einfluß der Substanzen auf in vitro-Modellsysteme ermittelt, bei denen die Radikalbildung unabhängig vom Cyt P450-Zyklus erfolgte:

- die Messung der Luminol-verstärkten Vollblutchemilumineszenz bei der Ratte und
- die Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz im Xanthinoxidase-System.

Bei der Auswahl der verschiedenen Pflanzen-Phenole sind strukturelle Unterschiede ganz bewußt berücksichtigt worden. In einigen Untergruppen der Flavonoide wurden deshalb mehrere Substanzen mit unterschiedlicher Anzahl von OH-Gruppen an verschiedenen Positionen getestet, um eventuell Rückschlüsse über besonders günstige Konstellationen zu ziehen und um damit bestimmte Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufdecken zu können.

Alle Prüfsubstanzen, sowohl die Pflanzen-Phenole als auch die Referenzstoffe (Ascorbinsäure, β -Karotin, Trolox und Harnsäure), zeigten bei den o. g. Modellversuchen deutliche antioxidative Eigenschaften. In mindestens vier von sechs Versuchen konnten bei jeder der 18 Prüfsubstanzen hemmende Einflüsse auf die Radikalbildung nachgewiesen

werden, wobei das Ausmaß der Hemmwirkung in den verschiedenen Modellversuchen in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz unterschiedlich ausgeprägt war.

„Echte“ Radikalfängereigenschaften könnten bei den Substanzen als wahrscheinlicher Wirkungsmechanismus vermutet werden, bei denen sich sowohl bei der Messung der VB-CL und /oder XO-CL als auch bei der LPO, der H_2O_2 -Bildung, der Lm-CL und der Lc-CL signifikante Hemmeffekte bezüglich der Radikalbildung ergaben. Für alle Substanzen konnten hemmende Einflüsse auf die VB-CL und XO-CL nachgewiesen werden. Weiterhin konnten deutlich hemmende Effekte bei den Untersuchungen zur Lm-CL und Lc-CL für fast alle Pflanzen-Phenole dokumentiert werden. Die Stoffe unterschieden sich lediglich in Bezug auf die Wirkungsstärke. Es zeigte sich ganz deutlich, daß die Pflanzenphenole, im Vergleich zu den Referenzsubstanzen, einen deutlich stärkeren Scavengereffekt hatten.

Insgesamt läßt sich schlußfolgern, daß alle Prüfsubstanzen antioxidative Eigenschaften besitzen. Es ist zu vermuten, daß dies wahrscheinlich „echte“ Scavengereigenschaften sind, da die VB-CL und die XO-CL im Hinblick auf die Radikalbildung gehemmt wurden.

Durch Untersuchung des spektralen Bindungsverhaltens der Prüfsubstanzen am Cytochrom P450 konnte festgestellt werden, ob die Substanzen in der Lage sind, die Biotransformation anderer Stoffe zu beeinflussen bzw. ob sie mit der Oxidase-Funktion des Cyt P450 interagieren. Für Substanzen, die keine Bindung eingehen, aber dennoch die Oxidase-Modellreaktionen hemmen, wäre anzunehmen, daß sie „echte“ Scavengereigenschaften besitzen. Von den vier Referenzsubstanzen bindet nur Ascorbinsäure an das Cyt P450. Von den 18 geprüften Pflanzenphenolen, konnte nur für 9 Substanzen eine Bindung nachgewiesen werden (Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Curcumin, Kaffeesäure, Ferulasäure, Apigenin, Naringenin und Catechin).

Unter den Pflanzenphenolen befand sich keine Substanz, die ausschließlich prooxidativ wirkte. Die stärksten Effekte zeigten sich bei der Messung der XO-CL. Am wenigsten aussagekräftig waren die Versuche zur H_2O_2 -Bildung.

Die Vitamine A und C sowie die Harnsäure zeigten ähnliche antioxidative Eigenschaften wie die Flavone. Nur das Vitamin E-Analogon Trolox erwies sich unter den Referenzsubstanzen als wirksamerer Scavenger. Insgesamt waren die Phenolcarbonsäuren und die Flavonole am besten antioxidativ wirksam. Diese bessere Wirksamkeit läßt sich folgendermaßen erklären: Mehrere Hydroxylgruppen am Grundgerüst wirkten sich günstig aus auf die Stärke der reduzierenden Wirkung; insbesondere eine Hydroxylgruppe an der Position 3 im C-Ring erwies sich als essentiell für Scavengereffekte.

6. Literaturverzeichnis

Allen RC (1986)

Phagocytic leucocyte oxygenation activities and chemiluminescence:
a kinetic approach to analysis.
Meth Enzymol 133: 449-493

Andlauer W, Fürst P (1998)

Der Einsatz von Phytochemicals in der Chemoprävention.
Arbeitstagung der DGE - "Sekundäre Pflanzenstoffe"
http://www.dge.de/Pages/navigation/fach_infos/abt6.htm

Antony S, Kuttan R, Kuttan G (1999)

Immunomodulatory activity of curcumin.
Immunol Invest 28: 291-303

Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR (1998)

Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis.
Molec Med 4: 376-383

Arora A, Nair MG, Strasburg GM (1998)

Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system.
Free Radic Biol Med 24: 1355-1363

Åström A, de Pierre JW (1986)

Rat-liver microsomal cytochrome P-450: purification, characterization, multiplicity and induction.
Biochem Biophys Acta 853: 1-27

Basile A, Giordano S, Lopez-Saez JA, Cibirichi RC (1999)

Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses.
Phytochem 52: 1479-1482

Bear WL, Teel RW (2000)

Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity.

Anticancer Research 20: 3609-3614

Beatty ER, O'Reilly JD, England TG, McAnlis GT, Young IS, Geissler CA, Sanders TA, Wiseman H (2000)

Effect of dietary quercetin on oxidative DNA damage in healthy human subjects.

Brit J Nutr 84: 919-925

Bitsch R (1996)

Pflanzenphenole und ihre gesundheitliche Wirkung.

Naturwiss Rdsch 49: 47-51

Bitsch R, Shahrzad S, Netzel, Bitsch I (1998)

Bioverfügbarkeit und Metabolismus pflanzlicher Phenole.

Arbeitstagung der DGE - "Sekundäre Pflanzenstoffe"

http://www.dge.de/Pages/navigation/fach_infos/abt3.htm

Block G, Patterson B, Subar A (1992)

Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence.

Nutr Cancer 18: 1-29

Böhm V, Bitsch R (1999)

Antioxidative Aktivität von Frucht- und Gemüsekonzentraten.

Nutrifood - Bioaktive Pflanzenstoffe

<http://www.nutrifood-complex.de/sps/antioxidativ.html>

Böhm V, Schlesier K, Bitsch R (1999)

Gesund durch pflanzliche Phenole.

Dtsch Apothekerztg 139: 53-55

Bors W (1987)

Bedeutung und Wirkungsweise von Antioxidanzien.

In: *Elstner EF, Bors W, Wilmanns W* (Hrsg.):

Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin: S. 161-183

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo

Bors W, Heller W, Michel C, Stettmaier K (1996)

Flavonoids and polyphenols: Chemistry and biology.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 409-466

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Bors W, Michel C (1999)

Antioxidant capacity of flavonols and gallata esters: Pulse radiolysis studies.

Free Rad Biol Med 27: 1413-1426

Bradlow HL, Telang NT, Sepkovic DW, Osborne MP (1999)

Phytochemicals as modulators of cancer risk.

Adv Exp Med Biol 472: 207-221

Bravo L (1998)

Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.

Nutrition Rev 56: 317-333

Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO (1999)

Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat.

Xenobiotica 29: 1227-1240

Brown LAS, Jones DP (1996)

The biology of ascorbic acid.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 117-154

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Bub A (1998)

Bioverfügbarkeit von Carotinoiden.

Arbeitstagung der DGE - "Sekundäre Pflanzenstoffe"

http://www.dge.de/Pages/navigation/fach_infos/abt7.htm

Buege JKA, Aust SD (1978)

Microsomal lipid peroxidation.

Meth Enzymol 52: 302-310

Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996)

Chemistry and biochemistry of ascorbic acid.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 91-115

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Burda S, Oleszek W (2001)

Antioxidant and antiradical activities of flavonoids.

J Agricult Food Chem 49: 2774-2779

Cavalli-Sforza L (1969)

Biometrie - Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik: S. 69-80

Gustav Fischer Verlag, Jena

Cheeseman KH, Slater TF (1993)

An introduction to free radical biochemistry.

Brit Med Bull 49: 481-493

Cimanga K, Ying L, de Bruyne T, Apers S, Cos P, Hermans N, Bakana P, Tona L, Kambu K, Kalenda DT, Pieters L, Vanden Berghe D, Vlietnick AJ (2001)

Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from *Bridelia ferruginea* stem bark.

J Pharm Pharmacol 53: 757-761

Conney, AH, Gillette JR, Inscoe JK, Trams ER, Posner HS (1959)

Induced synthesis of liver microsomal enzymes which metabolize foreign compounds.

Science 130: 1478-1479

Cooper DY, Levin SS, Narasimhulu S, Rosenthal O, Estabrook RW (1965)

Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems.

Science 147: 400-402

Croft KD (1998)

The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids.

Anal New York Acad Sci 854: 435-442

Dargel R (1992)

Lipid peroxidation – a common pathogenetic mechanism?

Exp Toxic Pathol 44: 169-181

Degtyarenko KN (updated 13.06.2000)

Accession numbers for P450 sequences.

http://www.icgeb.trieste.it/~p450srv/P450Nom_Full.html

de Lorimier AA (2000)

Alcohol, wine and health.

Am J Surgery 180: 357-361

DGE special 2/95 (22.05.1995)

Bioaktive sekundäre Pflanzenstoffe – Gesundheitsschutz aus Obst und Gemüse.

<http://www.dge.de/Pages/navigation/presse/spez0295.htm>

DGE special 1/97 (20.01.1997)

Sekundäre Pflanzenstoffe – Fitmacher in Apfel, Paprika und Co.

<http://www.dge.de/Pages/navigation/presse/spez0197.htm>

DGE special 5/2000 (19.09.2000)

“5-am-Tag” Obst und Gemüse - Arbeitstagung der DGE zur bundesweiten Kampagne.

<http://www.dge.de/Pages/navigation/presse/spez0500.htm>

DGE special 3/2001 (13.02.2001)

Gemüse und Obst schützen am besten vor Krebs.

<http://www.dge.de/Pages/navigation/presse/spez0301.htm>

Ding CK, Chachin K, Ueda Y, Imahori Y, Wang CY (2001)

Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development.

J Agric Food Chem 49: 2883-2888

Duthie G, Crozier A (2000)

Plant-derived phenolic antioxidants.

Curr Opin Lipidol 11: 43-47

Elstner EF (1990)

Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin: S. 25-88

BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich

Esterbauer H, Zollner H (1989)

Methods of determination of aldehydic lipid peroxidation products.

Free Radic Biol Med 7: 197-203

Faulkner K, Fridovich I (1993)

Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\bullet -}$.

Free Radic Biol Med 15: 447-451

Fichtl B, Fülgraff G, Neumann HG, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W (1992)

Grundbegriffe - Wirkungen des Organismus auf Pharmaka.

In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: S. 24-53

BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich (6. Auflage)

Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, de la Torre C, Marrugat J (2000)

Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation.

Lipids 35: 633-638

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993)

Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.

Lancet 341: 454-457

Fuhrmann GF (1994)

Umwandlung von toxischen Substanzen durch den Stoffwechsel.

In: *Fuhrmann GF* (Hrsg.): Allgemeine Toxikologie für Chemiker: S. 74-87

B.G. Teubner, Stuttgart

Fujii-Kuriyama Y, Mitukami Y, Kawajuri K, Sagawa K, Muramatsu M (1982)

Primary structure of a cytochrome P450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P450 cDNA from rat liver.

Proc Natl Acad Sci U.S.A. 79: 2793-2797

Garfinkle D (1958)

Studies on pig liver microsomes. I. Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions.

Arch Biochem Biophys 77: 493-509

Gassen M, Youdim MB (1999)

Free radical scavengers: Chemical concepts and clinical relevance.

J Neural Transm 56 (Suppl): 193-210

German JB, Walzem RL (2000)

The health benefits of wine.

Ann Rev Nutr 20: 561-593

Gibson GG, Skett P (1996)

Pathways of drug metabolism.

Enzymology and molecular mechanism of drug metabolism reactions.

In: Introduction to drug metabolism: 5-76

Blackie Academic & Professional, London

Gonzalez FJ (1992)

Human cytochromes P450: problems and prospects.

Trends Pharmacol Science 13: 346-352

Guengerich FP (1993)

Cytochrome P450 enzymes: They defend the body against environmental pollutants, detoxify drugs and synthesize several important molecules.

Am Scientist 81: 440-447

Hall ED, Braugher JM, Yonkers PA, Smith SL, Linsemann KL, Means ED, von Voightlander HM, Lahti RA, Jacobsen EJ (1991)

A potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia.

J Pharmacol Exp Ther 258: 688-694

Halliwell B (1994)

Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?

Lancet 344: 721-724

Halliwell B (1996-a)

Antioxidants in human health and disease.

Ann Rev Nutr 16: 33-50

Halliwell B (1996-b)

Uric acid: An example of antioxidant evaluation.

In: Cadenas E, Packer L (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 243-256

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Halliwell B, Gutteridge JM (1984)

Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy.

Lancet 334: 1396-1398

Halliwell B, Gutteridge JM (1990)

Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.

Meth Enzymol 186: 1-85

Handelman GJ (1996)

Carotenoids as scavengers of active oxygen species.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: 259-314

Marcel Dekker Inc.. New York, Basel, Hong Kong

Haniu M, Armes LG, Yasunobu KT, Shastry BA, Gunsalus IC (1982)

Amino acid sequence of the Pseudomonas putida cytochrome P-450.

J Biol Chem 257: 12664-126671

Harman D (1988)

Free radical theory of aging: Current status.

In: *Nagy Z* (Hrsg.): Lipofuscin: State of the art: S. 3-21

Elsevier, Amsterdam

Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A (2001)

Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups.

Toxicol in vitro 15: 3-6

Heilmann J, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuehly W, Harput S, Sticher O (2000)

Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leucocytes: Structure-activity relationships.

Planta Medica 66: 746-748

Heinemann FS, Ozols J (1983)

The complete amino acid sequence of rabbit phenobarbital-induced liver microsomal cytochrome P-450.

J Biol Chem 258: 4195-4201

Herrmann K (1994)

In pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als Antioxidantien.

Gordian 93: 108-111

Hertog M, Feskens E, Hollman P, Katan M, Kromhout D (1993)

Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.

Lancet 342: 1007-1011

Hildebrandt AG, Roots I, Tjoe M, Heinemeyer G (1978)

Hydrogen peroxide in hepatic microsomes.

Meth Enzymol 52: 342-350

Hollman PC, Katan MB (1999)

Health effects and bioavailability of dietary flavonols.

Free Radic Res 31 (Suppl): 75-80

Imai M, Shimada H, Watanabe Y, Matsushima-Hibiya Y, Makino R, Koga H, Horiuchi T, Ishimura Y (1989)

Uncoupling of the cytochrome P450_{cam} monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: A possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation.

Proc Natl Acad Sci U.S.A. 86: 7823-7827

Karakaya S, El SN, Ta AA (2001)

Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds.

Intern J Food Sci Nutr 52: 501-508

Kehrer JP (1993)

Free radicals as mediators of tissue injury and disease.

Crit Rev Toxicol 23: 21-48

Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, Sigman CC (2000)

Progress in cancer chemoprevention: Development of diet-derived chemopreventive agents.

J Nutr 130, 2S Suppl: 467-471

Kishida T, Nashiki K, Izumi T, Ebihara K (2000)

Soy isoflavonoid aglycons genistein and daidzein do not increase the cytochrome P-450 content of the liver microsomes of mice.

J Agricult Food Chem 48: 3872-3875

Klingenberg M (1958)

Pigments of rat liver microsomes.

Arch Biochem Biophys 75: 376-386

Klinger W (1982)

Biotransformation of drug and other xenobiotics during postnatal development.

Pharmacol Ther 16: 377-429

Klinger W (1995)

Drug metabolism, lipid peroxidation and glutathione.

In: *Arinc E, Schenkman JB, Hodgson E* (Hrsg.)

Molecular aspects of oxidative drug metabolizing enzymes: Their significance in environmental toxicology, chemical carcinogenesis and health: S. 515-532

NATO ASI Series, Series H, Vol. 90:

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest

Klinger W (1996)

Biotransformation of drugs and other xenobiotics during postnatal development.

Exp Toxic Pathol 48: (Suppl I) 1-88

Klinger W, Müller D (1974)

The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods.

Z Versuchstierk 16: 149-153

Klinger W, Freytag A, Schmitt W (1986)

Influence of age, hexobarbital and aniline on NADPH/NADH dependent hydrogen peroxide production in rat hepatic microsomes.

Arch Toxicol 9 (Suppl): 382-385

Klinger W, Karge E, Kretzschmar M, Schulze HP (1994)

Lucigenin amplified chemiluminescence with rat liver microsomes: kinetics and influence of ascorbic acid, dimethylsulfoxide, catalase, superoxidedismutase, hexobarbital and aniline.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 349 (Suppl): R456

Klinger W, Karge E, Kretzschmar M, Rost M, Schulze HP, Dargel R,

Reinemann C, Rein H (1996)

Luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence with rat liver microsomes.

Exp Toxic Pathol 48: 447-460

Kloos K (1999)

Sekundäre Pflanzenstoffe: Neue Wirkstoffe für functional food.

Nutrifood - News

http://www.nutrifood.de/nutrifood/d/news/news_1.html

Kretzschmar M, Giese R, Klinger W (1989)

Rolle freier Radikale in der Pathogenese menschlicher Erkrankungen.

Med Aktuell 15: 530-532

Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH (2000)

Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages.

J Agric Food Chem 48: 2848-2852

Landvik SV, Diplock AT, Packer L (1996)

Efficacy of vitamin E in human health and disease.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 63-87

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Lee SK, Mbwambo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJ, Mehta RG, Kinghorn AD,

Pezzuto JM (1998)

Evaluation of the antioxidant potential of natural products.

Comb Chem High Throughput Screen 1: 35-46

Lewis DFV (1996)

Evolution of the P450 superfamily.

The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism.

In: *Lewis DFV* (Hrsg.)

Cytochromes P450 – Structure, Function and Mechanism: S. 55-109

Taylor & Francis, Washington, Bristol

Limasset B, Ojasoo T, le Doucen C, Dore JC (1999)

Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic acids and flavonoids.

Planta Medica 65: 23-29

Livrea MA, Tesoriere L, Freisleben HJ (1996)

Vitamin A as an antioxidant.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 371-405

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Lu AYH, Coon MJ (1968)

Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes.

J Biol Chem 243: 1331-1332

Lupp A, Hertel H, Luthart S, Rose O, Karge E, Klinger W, Ziegler A (1995)

Effect of calcium antagonists on the microsomal cytochrome P450 system of rat livers in vitro.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 351 (Suppl): R22

Lupp A, Karge E, Klinger W (1996)

Antioxidant properties of NMDA-receptor agonists and antagonists on the microsomal cytochrome P450 system of rat livers in vitro.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 353 (Suppl): R108

Makris DP, Rossiter JT (2001)

Comparison of quercetin and a non-orthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions.

J Agricult Food Chem 49: 3370-3377

Matsubara T, Koike M, Touchi A, Tochino Y, Sugeno K (1976)

Quantitative determination of cytochrome P450 in rat liver homogenate.

Anal Biochem 75: 596-603

Maxwell SRJ (1995)

Prospects for the use of antioxidant therapies.

Drugs 49: 345-361

Melville CAS (1994)

Red wine, tea and antioxidants.

Lancet 344: 626

Miean KH, Mohamed S (2001)

Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants.

J Agricult Food Chem 49: 3106-3112

Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG (1998)

Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems.

Arch Biochem Biophys 360: 142-148

Miura YH, Tomita I, Watanabe T, Hirayama T, Fukui S (1998)

Active oxygens generation by flavonoids.

Biol Pharmaceut Bull 21: 93-96

Moline J, Bukharrovich IF, Wolff MS, Phillips R (2000)

Dietary flavonoids and hypertension: Is there a link?

Med Hypoth 55: 306-309

Morton LW, Caccetta AR, Puddey IB, Croft KD (2000)

Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease.

Clin Exp Pharmacol Physiol 27: 152-159

Müller D (1976)

Der Einfluß des Lebensalters und des Induktors Phenobarbital auf die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenierung von Arzneimitteln in der Rattenleber.

Dissertation B, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Müller D (1990)

Influence of xenobiotics on drug metabolism and its sensitive detection.

Exp Pathol 39:187-194

Müller-Peddinghaus R, Wurl M (1987)

The amplified chemiluminescence test to characterize antirheumatic drugs as oxygen radical scavengers.

Biochem Pharmacol 36: 1125-1132

Nagao A, Seki M, Kobayashi H (1999)

Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids.

Biosci Biotech Biochem 63: 1787-1790

Nebert DW, Gonzalez FJ (1987)

Cytochrome P 450 genes: structure, evolution and regulation.

Ann Rev Biochem 56: 945-993

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Conn MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW (1993)

The P-450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature.

DNA and Cell Biol 12: 1-51

Newmark HL (1996)

Plant phenolics as potential cancer prevention agents.

Adv Exp Med Biol 401: 25-34

Nielsen SE, Breinholdt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO (1998)

In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes.

Xenobiotica 28: 389-401

Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME (1998)

Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes.

Am J Clin Nutr 67: 1210-1218

Oberley LW (1988)

Free radicals and diabetes.

Free Radic Biol Med 5: 113-124

O`Brien PJ (1982)

Peroxide-mediated metabolic activation of carcinogenesis.

In: *Yagi K* (Hrsg.): *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*: S. 317-338

Academic Press, New York

Oesch F (1994)

Fremdstoffmetabolismus.

In: *Marquardt H, Schäfer SG* (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*: S. 68-93

BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

Omura T, Sato R (1961)

A new cytochrome in liver microsomes.

J Biol Chem 237: PC1375-PC1376

Omura T, Sato R (1964-a)

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature.

J Biol Chem 239: 2370-2378

Omura T, Sato R (1964-b)

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties.

J Biol Chem 239: 2379-2385

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H (2000)

The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil.

Europ J Cancer 36: 1235-1247

Packer L (1992)

New horizons in vitamin E research – The vitamin E cycle, biochemistry, and clinical applications.

In: *Ong ASH, Packer L* (Hrsg.): *Lipid-soluble antioxidants: Biochemistry and clinical applications*: S. 1-16

Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin

Paganga G, Miller N, Rice-Evans CA (1999)

The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities.

Free Rad Res 30: 153-162

Paladini AC, Marder M, Viola H, Wolfman C, Wasowski C, Medina JH (1999)

Flavonoids and the central nervous system: From forgotten factor to potent anxiolytic compounds.

J Pharm Pharmacol 51: 519-526

Pfeifer S, Pflegel P, Borchert HH (1995)

Biopharmazie: Pharmakokinetik; Bioverfügbarkeit; Biotransformation: S. 89-176

Ullstein Mosby GmbH, Wiesbaden

Pietta PG (2000)

Flavonoids as antioxidants.

J Natural Products 63: 1035-1042

Poulus TL, Finzel BC, Gunsalus IC, Wagner GC, Kraut J (1985)

The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450.

J Biol Chem 260: 16122-16130

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F (2000)

Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay.

J Agricult Food Chem 48: 3396-3402

Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Meier C, Kaehkoenen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM (2001)

Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries.

J Appl Microbiol 90: 494-507

Renaud S, de Lorgeril M (1992)

Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.

Lancet 339: 1523-1526

Renkawitz A (1999)

Bioaktive sekundäre Pflanzenstoffe.

Ernährungsreport 7: 3-10

Rhodes MJC (1996)

Physiologically-active compounds in plant foods: An overview.

Proc Nutr Soc 55: 371-384

Rhodes MJC, Price KR (1997)

Identification and analysis of plant phenolic antioxidants.

Europ J Cancer Prev 6: 518-521

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997)

Antioxidant properties of phenolic compounds.

Trends Plant Sci 2: 152-159

Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean ME (2001)

Tea flavonoids and cardiovascular health.

Q J M 94: 277-282

Rost M, Karge E, Lupp A, Klinger W (1998-a)

What do we measure with luminol and lucigenin amplified chemiluminescence?

Investigations with xanthine oxidase.

J Biolum Chemilum 13: 350-354

Rost M, Karge E, Klinger W (1998-b)

What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin-amplified chemiluminescence? Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite.

J Biolum Chemilum 13: 355-363

Ruckpaul K (1993)

Cytochrom P-450 abhängige Enzyme - Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung?

Pharmazie in unserer Zeit 22: 296-304

Santos KF, Oliviera TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliviera MG (1999)

Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations.
Pharmacol Res 40: 493-496

Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H (1999)

Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables.
J Agricult Food Chem 47: 397-402

Scalbert A, Williamson G (2000)

Dietary intake and bioavailability of polyphenols.
J Nutr 130 (Suppl 8): 2073-2085

Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW (1967-a)

Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol Pharmacol 3: 113-123

Schenkman JB, Cinti LD, Moldeus PW, Orrenius S (1967-b)

Newer aspects of substrate binding to cytochrome P-450.
Drug Metab Dispos 1: 111-120

Schlesier K, Böhm V, Bitsch R (1999)

Relativer Anteil der Catechine am antioxidativen Potential von grünem Tee.
Lebensmittelchemie 53: 109

Shertzer HG, Puga A, Chang C, Smith P, Nebert DW, Setchell KD, Dalton TP (1999)

Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones.
Chemico-Biological Interactions 123: 31-49

Sies H (1997)

Oxidative stress: Oxidants and antioxidants.
Exp Physiol 82: 291-295

Silman N, Artman M, Engelberg H (1965)

Effect of magnesium and spermine on the aggregation of bacterial and mammalian ribosomes.

Biochem Biophys Acta 103: 231-240

Silva FA, Borges F, Guimares C, Lima JL, Matos C, Reis S (2000)

Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters.

J Agricult Food Chem 48: 2122-2126

Soucek P, Gut I (1992)

Cytochromes P-450 in rats: Structures, functions, properties and relevant human forms.
Xenobiotica 22: 83-103

Stahl W (1998)

Carotinoide: Funktionen und biochemische Wirkungen.

Arbeitstagung der DGE - "Sekundäre Pflanzenstoffe"

http://www.dge.de/Pages/navigation/fach_infos/abt8.htm

Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K (1999)

Anti- and prooxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid-hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid.

Free Radic Biol Med 27: 1313-1323

Surh Y (1999)

Molecular mechanisms of chemoprotective effects of selected dietary and medicinal phenolic substances.

Mutation Res 428: 305-327

Swanson JE, Parker RS (1996)

Biological effects of carotenoids in humans.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 337-367

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Törrönen R, Häkkinen S, Kärenlampi S, Mykkänen H (1997)

Flavonoids and phenolic acids in selected berries.

Cancer Letters 114: 191-192

Tomita M, Okuyama T, Kawai S (1990)

Determination of malonaldehyde in oxidized biological materials by high-performance liquid chromatography.

J Chromatogr 515: 391-397

Volicer L, Crino PB (1990)

Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: a hypothesis.

Neurobiol Aging 11: 567-571

Weisburger JH (1996)

Tea antioxidants and health.

In: *Cadenas E, Packer L* (Hrsg.): Handbook of Antioxidants: S. 469-486

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

Wenzel U (1998)

Flavonoide – Biologische Wirkungen einer Klasse von sekundären Pflanzenstoffen.

Arbeitstagung der DGE - "Sekundäre Pflanzenstoffe"

http://www.dge.de/Pages/navigation/fach_infos/abt5.htm

Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Cuoteau D (2000)

Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates.

Biochem Soc Transact 28: 16-22

Wollin SD, Jones PJ (2001)

Alcohol, red wine and cardiovascular disease.

J Nutr 131: 1401-1404

Yin F, Giuliano AE, van Herle AJ (1999)

Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines.

Thyroid 9: 369-376

Younes M (1994)

Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies.

In: *Marquardt H, Schäfer SG* (Hrsg.): Lehrbuch der Toxikologie: S. 68-93

BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

Zieliski H, Kozowska H (2000)

Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions.

J Agricult Food Chem 48: 2008-2016

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. Ch. Fleck,

Frau Dr. med. A. Lupp,

Frau Dipl.-Ing. (FH) E. Karge sowie

Herr M. Förstemann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weinböhla, den 28.06.2002

Elisabeth Förstemann

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit wesentlich mit beigetragen haben.

Mein erster Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Christian Fleck, der mir das Thema der vorliegenden Promotion freundlicherweise überließ.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. Amelie Lupp, die mein ständiger Ansprechpartner war, für die stets gewährte Unterstützung in allen Phasen der Erstellung dieser Arbeit sowie die wertvollen Hinweise während der Manuskriptarbeit.

Gleichfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dipl.-Ing. (FH) Elke Karge für die großartige Zusammenarbeit im Rahmen der Vorbereitung und Durchführung der Versuche bedanken.

Weiterhin danke ich meinem ältesten Sohn Matthias Förstemann für seine unermüdliche Hilfe während meinen Arbeiten am PC, insbesondere aber bei den graphischen Darstellungen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner langjährigen Ärztlichen Direktorin, Frau Dr. Erika Starck, meinen ärztlichen Kollegen und den Mitarbeitern im Labor des Institutes für Transfusionsmedizin Dresden sowie meiner Familie. Durch sie wurde ich immer wieder zur Anfertigung der Promotionsarbeit motiviert.